Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen

ÜBER DEN LICHTABHÄNGIGEN STOFFWECHSEL VON CHLOROGONIUM ELONGATUM DANGEARD BEI AUTOTROPHER ANZUCHT

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Holger Zeidler
aus Glauchau/Sachsen

Göttingen 1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0038

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen

ÜBER DEN LICHTABHÄNGIGEN STOFFWECHSEL VON CHLOROGONIUM ELONGATUM DANGEARD BEI AUTOTROPHER ANZUCHT

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Holger Zeidler
aus Glauchau/Sachsen

Göttingen 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Pirson
Korreferent: Prof. Dr. H. Lorenzen

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1973

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	Verzeichnis der Abkürzungen	1
I.	EINLEITUNG	2
II.	MATERIAL UND METHODEN	
	1. Algenmaterial	4
	2. Kulturmedium und Kulturbedingungen	4
	3. Hinweise zur "Voranzucht" und zur Kultivierung	7
	4. Anmerkungen zu Zellform und Zellentwicklung	9
	5. Bestimmungsmethoden	12
	6. Enzymuntersuchungen	16
	7. Chemikalien	19
III.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	
A.	Versuche zur Synchronisierung	20
	1. Der Einfluß von Licht-Dunkel-Wechseln	20
	2. Der Einfluß von Temperaturwechseln	33
	3. Einfluß der Kombination von Licht-Dunkel-Wechsel mit Temperaturwechsel	34
	4. Untersuchungen im Rotlicht- bzw. Blaulicht-Dunkel-Wechsel 6:6	34
	5. Untersuchungen im Starklicht-Schwachlicht-Wechsel	35
	6. Untersuchungen im Licht-Dunkel-Wechsel bei Acetat-Ernährung	35
	7. Versuche mit Vinblastinsulfat	36
B.	Die Zusammensetzung autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen im Licht und im Dunkeln	37
C.	Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen im Dunkeln	41
D.	Der Einfluß von Belichtung und Verdunkelung auf die Kernteilung autotroph ernährter Zellen	50
E.	Untersuchungen des DNA-Gehalts im Licht und im Dunkeln bei autotropher Ernährung	54

F. Wirkungen von Pyrimidin- und Purinderivaten auf die Kernteilung bei autotroph ernährten Chlorogonien im Dunkeln 59

G. Der Einfluß von Acetat auf das Wachstum im Dunkeln 66

H. Untersuchungen von Enzymaktivitäten 68

1. Vergleich von Enzymaktivitäten bei photoautotropher, mixotropher und heterotropher Anzucht 68

2. Enzymaktivitäten der ICDH und G6PDH autotroph ernährter Zellen im Licht und im Dunkeln 73

IV. DISKUSSION 78

V. ZUSAMMENFASSUNG 85

VI. LITERATURVERZEICHNIS 87

Anmerkung:
Die angegebenen Vergrößerungen zu den mikroskopischen Abbildungen auf S. 9, 11, 12, 25, 26, 28 und 51 beziehen sich auf das Original dieser Arbeit im DIN A 4 - Format; im vorliegenden Dissertationsdruck (DIN A 5) sind diese Angaben mit dem Faktor 0.7 zu korrigieren.

Verzeichnis der in Text und Bild verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Ac	Natrium-Acetat
BA	Benzyladenin
C	Cytosin
cAMP	Adenosin-3',5'-phosphat cyclisch
Chl	Chlorophyll
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl-)1,1-dimethylharnstoff
DH	Dehydrogenase
DSSR	5-Dehydroxyshikimisäurereduktase
E	Extinktion
EDTA	Aethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
G	Guanin
G6P	Glucose-6-phosphat (Dinatriumsalz)
IC	Isocitrat
K	Kinetin
KH	Kohlenhydrat
LDW	Licht-Dunkel-Wechsel
N	Stickstoff
$NAD(P)^+$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat)
PCA	Perchlorsäure
Pr	Protein
RZZ	Relative Zellzahl
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triaethanolamin
TG	Trockengewicht
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

I. EINLEITUNG

Chlorogonium elongatum DANGEARD wurde bereits von PRINGSHEIM (1937, 1960, 1967) auf Grund ernährungsphysiologischer Untersuchungen als chlorophyllhaltiger Acetatflagellat gekennzeichnet; aber auch photoautotroph kann Chlorogonium elongatum gut wachsen. Sowohl unter heterotrophen, mixotrophen wie auch autotrophen Ernährungsbedingungen weist diese Alge deutlich höhere "Wachstumskonstanten" auf als die häufig verwendeten Objekte Chlorella oder Euglena (STABENAU, 1971). Allerdings wurde dieser zu so hoher Produktionsleistung fähige Organismus bisher nur in asynchronen Kulturen angezogen (STABENAU, 1971; GERHARDT und BERGER, 1971; STABENAU, 1972 a, 1972 b, 1973). Für Wachstums- und Stoffwechseluntersuchungen ist jedoch oft das Vorhandensein physiologisch weitgehend einheitlichen synchronen Zellmaterials wünschenswert; erst Untersuchungen an synchron wachsenden Kulturen ermöglichen Aussagen über das Verhalten einer Einzelzelle unter den jeweils vorliegenden Bedingungen, wobei sich die Auswirkungen unterschiedlicher Ernährungsweisen (autotroph, mixotroph, heterotroph) am besten vergleichen lassen. Da Chlorogonium bedeutende ernährungsphysiologische Unterschiede zu den Chlorococcalen vom Chlorella- oder Scenedesmus-Typ aufweist, schien es auch im Sinne einer vergleichend-physiologischen Betrachtung lohnend, sich um eine Synchronisierungsmethode für diesen Organismus zu bemühen.
Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage der Synchronisierbarkeit des Objekts unter

Berücksichtigung verschiedener Verfahren. Im folgenden wird durch Untersuchungen im Licht und im Dunkeln nachgewiesen, daß die gesamte Zellentwicklung - im Gegensatz zu Chlorella oder Chlamydomonas - lichtabhängig ist.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Algenmaterial

Als Versuchsobjekt diente die einzellige Chlamydomonaceae Chlorogonium elongatum DANGEARD Stamm 16 der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen.
Die Stammkulturen wurden als axenische Flüssigkeitskulturen in dem unten angegebenen Medium unter Zusatz von 1% Bacto-Pepton (DIFCO) und 0,05% Natrium-Acetat bei Zimmertemperatur und Tageslicht in Reagenzgläsern angezogen. Im Winterhalbjahr wurden die Stammkulturen bei Eintritt der Dämmerung zusätzlich für 3-6 Stunden mit einer mattierten 40 Watt-Glühbirne aus einem Abstand von ungefähr 20 cm belichtet.
Zur Erhaltung der Stammkulturen wurden die Algen stets im Abstand von 5-10 Tagen je nach Dichte mit einer Spritze bakterienfrei in frisches Nährmedium übergeimpft; eine unmittelbar daran anschließende künstliche Belichtung der Zellen (mit der oben genannten Lichtquelle) von mindestens 12 Stunden erwies sich dabei als zweckmäßig.

2. Kulturmedium und Kulturbedingungen

Die Anzucht der Algen für Versuchszwecke erfolgte in bakterienfreier Reinkultur in mineralischer Nährlösung folgender Zusammensetzung:

KCl	10^{-3} M
Na_2HPO_4	$2{,}55 \cdot 10^{-3}$ M
KH_2PO_4	$7{,}4 \cdot 10^{-4}$ M
$MgSO_4$	$2 \cdot 10^{-4}$ M
$CaCl_2$	10^{-4} M
$(NH_4)_2HPO_4$	10^{-2} M

Die Spurenelemente wurden nach den Angaben von KUHL (1962) angesetzt, jedoch dem Nährmedium in doppelter Menge zugegeben. Als Eisenquelle diente der bei KUHL und LORENZEN (1964) beschriebene Fe-EDTA-Komplex, doch wurde auch hier die Eisenkonzentration im Nährmedium auf $5 \cdot 10^{-5}$ M verdoppelt (vgl. LAUDENBACH und PIRSON, 1969). Die Fe-EDTA-Lösung und die übrige Nährlösung wurden getrennt über einen Zeitraum von 30-40 Min. im Autoklaven bei 1,1-0,9 atü sterilisiert; die erforderliche Eisenmenge wurde dem Nährmedium erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben. Diese Nährlösung wird im folgenden als Standardnährmedium bezeichnet. Sämtliche Kulturmedien wurden mit Austauscherwasser und analysenreinen Chemikalien angesetzt.
Der pH-Wert der Nährlösung lag nach dem Autoklavieren zwischen pH 7,3 und 7,5 und änderte sich unter den gewählten Versuchsbedingungen nur geringfügig (Endwerte pH 6,7-6,9). Bei Kulturen, die in Licht-Dunkel-Wechsel-Versuchen angezogen wurden, waren die pH-Schwankungen noch geringer, da durch Verdünnen der Kulturen mit frischer Nährlösung am Ende jeder Dunkelzeit der ursprüngliche Ausgangswert annähernd wieder eingestellt wurde.

Stickstofffreies Nährmedium wurde hergestellt, indem $(NH_4)_2HPO_4$ äquimolar durch K_2HPO_4 ersetzt wurde; hierbei war die auftretende pH-Verschiebung ins Alkalische (pH 11-11,3 !) durch Zugabe von 1 n HCl p.a. (ca. 1 ml pro 100 ml Stickstoffmangel-Nährlösung) zu korrigieren. Der so eingestellte pH-Wert blieb auch am Ende der N-Mangel-Versuche im für Chlorogonium elongatum physiologisch günstigen Bereich von pH 6,7-6,9 .

Bei Anzucht in organischem Medium wurde der oben genannten Nährlösung noch 0,2% wasserfreies Natriumacetat zugesetzt (WIESSNER, 1968). Hierbei wurde der pH-Wert bei längerer Kultur (nicht jedoch im LDW, s.o.) allmählich in den alkalischen Bereich verschoben; eine Alkalisierung über den pH-Wert 7,8 hinaus konnte in keinem Fall

festgestellt werden (vgl. STABENAU, 1969). Zu einer Beeinträchtigung des Wachstums kam es nicht.

In einigen Fällen wurde zum Vergleich auch die verwandte Volvocale Chlamydomonas reinhardii DANGEARD (Stamm 11-32/89 der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen) herangezogen. Die Stammkulturen (Anzucht nach STEUP, 1972) wurden ebenso wie die Versuchskulturen in dem bei KUHL und LORENZEN (1964) angegebenen Nährmedium gezogen.
Bei N-Mangel-Kulturen wurde in der Nährlösung KNO_3 äquimolar durch KCl ersetzt.

Sowohl die Voranzucht[+] der Algen wie auch die eigentlichen Versuchsanzuchten erfolgten in Lichtthermostaten nach LORENZEN (1959) unter weitgehend konstanten Temperaturbedingungen (Wachstumstemperatur für alle untersuchten Algen, wenn nicht anders angegeben, 32°C). Hierbei wurden die Algen in mit Wattestopfen verschließbaren Durchlüftungsröhren aus Jenaer Geräteglas (Durchmesser 4 cm) mit seitlichem Begasungsrohr in 300 ml Nährlösung bzw. teilweise in den kleineren bei KOWALLIK (1962) beschriebenen Röhren (Durchmesser 3 cm, Fassungsvermögen 100 ml Nährlösung) oder in Sterilkulturröhren nach ULRICH (1963) kultiviert. Vor Gebrauch wurden die Röhren auf gleiche Weise wie die Nährlösung autoklaviert.
Bei allen Versuchen diente der laufenden Begasung der Kulturen ein CO_2-Luft-Gemisch (2:98 Vol.%), dessen Zusammensetzung mittels einer Mischsäule laufend kontrolliert und erforderlichenfalls korrigiert wurde; das Gasgemisch wurde durch als Filter wirkende wattegefüllte Oliven in die Kulturröhren eingeleitet; diese Maßnahme trug mit dazu bei, die Kulturen für längere Zeit bakterienfrei zu halten. Zur Überwachung der Kulturen wurden ständig mikroskopische Kontrollen vorgenommen.

[+] Näheres unter 3., Seite 7

Die Beleuchtungsstärke - gemessen hinter den Doppelscheiben der Lichtthermostate im Wasser mit einem Lux-Meter der Firma B. LANGE, Berlin - betrug in der Regel 12 000 Lux (Lichtquellen: 5 PHILIPS-Leuchtstoffröhren, Typenbezeichnung Warmton de Luxe TL 40 W 1/32 = "Warmtonlicht"). Die Werte 12 000 Lux Warmtonlicht / 32°C gelten als Standardbedingungen; Abweichungen hierzu werden jeweils angegeben.
Das für Farblichtversuche benötigte Rotlicht bzw. Blaulicht wurde durch die Versuchsanordnung nach STEUP (1972) erhalten (als Standardeinstellungen wurden 35 000 bzw. 20 000 erg/cm^2. sec gewählt). Die hierbei verwendeten Durchflußküvetten sind ebenfalls bei STEUP (1972) ausführlich beschrieben.

3. Hinweise zur "Voranzucht" und zur Kultivierung

Bevor die eigentlichen Versuchsanzuchten vorgenommen wurden, wurden die Algen einer sog. Voranzucht unterworfen; diese sollte u.a. dazu dienen, daß sich die in Stammkulturen wachsenden Zellen auf die stark veränderten Bedingungen im Lichtthermostaten (Licht, Temperatur, Begasung, Nährmedium) einstellen konnten. Während der Voranzucht wurden die Algen täglich in unregelmäßigen Abständen für 3-4 Stunden verdunkelt (vgl. auch STEUP, 1972) und mindestens einmal verdünnt (je nach optischer Dichte im Verhältnis 1:2 bis 1:5). Von diesen Voranzuchten wurden dann 24 Stunden vor Versuchsbeginn bestimmte Algenmengen in frisches Nährmedium überführt und im Dauerlicht weiterkultiviert. Nach Erreichen der Dichte E_{1000}= 1,2-1,5 wurden die asynchronen Massenkulturen durch Verdünnen auf eine definierte, je nach Versuchsanstellung zweckmäßige Startdichte bzw. bei Versuchen in Licht-Dunkel-Wechseln auf eine definierte relative Zellzahl eingestellt und die Versuche mit diesen Kulturen (Versuchskulturen) begonnen. Die Erneuerung der Vorkulturen durch frisches Abimpfen von

einer neuen Stammkultur wurde alle 7-10 Tage vorgenommen.

Bei Versuchen mit Chlorogonium elongatum Stamm 16 ist (besonders bei autotrophen Anzuchten) zu beachten, daß die Voranzuchten eine Dichte von E_{1000}= 2 nicht überschreiten sollten, da die Algen in diesem Fall durch den "Verdünnungssprung", selbst wenn dieser sehr klein gehalten wird (z.B. 1:1) unkontrollierbar - u.U. sogar mit einem letalen Schock - reagieren können. Die Kulturen erreichen in solchen Fällen dann im weiteren Fortgang ihrer Anzucht oft nur noch geringere Dichten (bis E_{1000}= 0,8 oder sogar nur bis 0,6) und haben eine grüngelbliche Färbung; ihr Stickstoffgehalt ist im Licht deutlich reduziert, und die Zellen sind teilweise nicht oder nur mäßig beweglich. Auch plötzlich auftretendes Schäumen autotroph gezogener Chlorogonien beim Kultivieren und das Festhaften der Zellen an den Glaswänden der Kulturröhren wie auch aneinander sind Hinweise für eine unbrauchbare Kultur. In extremen Fällen kann es zum Absterben der Kulturen kommen (Vergilben, "Stärketod"). Ähnliche Störungen können auftreten, wenn die Stammkulturen zu dicht geworden sind bzw. anderweitig eine Schädigung (Temperaturschock o.ä.) erfuhren. Deshalb ist eine sehr sorgfältige und aufmerksame Behandlung schon der Stammkulturen von größter Wichtigkeit. Eine einmal "geschädigte" Stammkultur läßt sich in der Vorkultur nicht mehr regenerieren und ist deshalb unbedingt durch neues Ausgangsmaterial zu ersetzen.

Tests auf Bakterien- und Pilzbefall, pH-Kontrollen, Analysen der Zellzusammensetzung, Zufuhr der Vitamine B_{12} (0,02 mg/l) und B_1 (0,2 mg/l) gaben keine Anhaltspunkte für die Ursachen dieser auffälligen Empfindlichkeit der Chlorogonium-Populationen.

4. Anmerkungen zu Zellform und Zellentwicklung

In zu dicht gewordenen Kulturen kamen gelegentlich - abweichend von den sonst in einer asynchronen Massenkultur unter normalen Bedingungen üblichen Zoosporenmutterzellen mit 2, 4, (6) und 8 Zoosporen - Mutterzellen mit 16 und mehr Teilungsprodukten vor (Abb. 1).

Abb. 1

Chlorogonium-Mutterzelle mit wesentlich mehr als 8 Teilungsprodukten (zwischen 16 und 32)

Vergrößerung ca. 750 fach

Sowohl innerhalb der Mutterzellen als auch nach ihrer Freisetzung zeichneten sich diese kleinen Zellen durch besonders starke Beweglichkeit aus; auch STABENAU (persönliche Mitteilung) und KERSTEN (persönliche Mitteilung) beobachteten mitunter in Kulturen des Stammes 2 E solche Zellen. Diese ließen sich rein morphologisch nicht, wie nach Angaben von HARTMANN (1956) vermutet werden könnte, als Gameten charakterisieren. KORSCHIKOFF (1923) gibt als typische Kennzeichen der Gameten das Vorhandensein nur eines Pyrenoids und zweier kontraktiler Vakuolen an. Versuche, eine Gametenbildung planmäßig zu induzieren und danach eine Kopulation zu erreichen[+], konnten

---

[+] Versucht wurden: Stickstoffentzug; Dicht-Werden-Lassen der Kulturen; Verdünnen der Kulturlösung nach STREHLOW 1928/29; Übertragen der Zellen aus Nährlösung in reines Wasser nach OLTMANNS 1923, wobei sowohl Leitungswasser, Ionenaustauscherwasser als auch bidestilliertes Wasser verwendet wurden; Hängetropfenkulturen zum Auslösen von Kopulationen nach STREHLOW 1928/29.

nicht zur Klärung des Problems beitragen. KOCH (persönliche Mitteilung) fand bei den vorliegenden Stämmen ebenfalls keine sicheren Hinweise für das Auftreten von Gameten. Zygoten, die als Kopulationsprodukte auftreten müßten und nach KORSCHIKOFF (1923) und STREHLOW (1928/29) durch reichliche Speicherung von Reservestoffen ein granulöses Aussehen bekommen, sich mit einer glatten Membran umgeben und sich infolge Hämatochrombildung rot färben sollen, ließen sich nie beobachten.

Unter Beachtung der geschilderten Voranzuchtbedingungen ließ sich jedoch eine problemlose Kultur erreichen; doch ist besondere Aufmerksamkeit stets angezeigt. Bei Anzucht mit Acetat ist eine besondere Vorkultur nicht erforderlich; doch sollten die frisch angeimpften Kulturen nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wenigstens ein- bis zweimal verdünnt werden, bevor die Algen für Versuche verwendet werden. Auch hier muß auf äußerst sorgfältige Arbeitsweise geachtet werden, da schon geringfügige Verunreinigungen durch Bakterien die Kulturen innerhalb kürzester Zeit unbrauchbar machen.

In diesem Zusammenhang soll auf einen weiteren Befund aufmerksam gemacht werden, dessen Deutung ebenfalls noch offen ist. Bei Chlorogonium elongatum Stamm 16 - und noch viel ausgeprägter beim Stamm 2 E - kam es im Verlaufe unserer Arbeiten bevorzugt im Sommerhalbjahr (März bis Oktober) wiederholt zur Ausbildung von abweichenden Zellformen; KERSTEN (unveröffentlicht) konnte an dem von ihm untersuchten Stamm 2 E gelegentlich regelrechte Häufungen von kopulationsähnlichen Stadien beobachten; auffällig war dabei, daß diese Zellen zwei Geißelpole besitzen (Abb. 2) und oft sichelförmig gestaltet sind. Mitunter tendierten diese Zellen zur Zusammenlagerung; zu vollständigen Verschmelzungen kam es jedoch nicht (STREHLOW machte 1928/29 bei einem Stamm von Chlorogonium elongatum ähnliche Feststellungen). Mitunter waren aber auch Zellstadien vorhan-

den, die nach den Angaben von DANGEARD (1888 a, 1888 b), OLTMANNS (1923), STREHLOW (1928/29) und HARTMANN (1956) als Kopulationen bzw. als Kopulationsversuche gedeutet werden müßten; eine Beobachtung der Weiterentwicklung solcher Stadien brachte jedoch keine Aufklärung. Gelegentlich entstand bei solchen Stadien der Eindruck, es handele sich um einen besonderen Zellteilungsmodus mit unvollständigem Ablauf.

Abb. 2 Kopulationsähnliche Stadien von Chlorogonium elongatum Stamm 16

Vergrößerung ca. 750 fach

Gelegentlich wurden (sowohl im Sommer- als auch im Winterhalbjahr) Zellen gebildet, welche von der üblichen Form sehr abwichen, oft ganz unregelmäßig ausgebildet waren, spitze Fortsätze hatten oder rundlich ausgebuchtet waren (Abb. 3). Ähnliche Zellen beschrieb schon JACOBSEN (1910). Der Anteil solcher Zellen war - sofern sie auftraten - stets gering (beim vorliegenden Stamm maximal 5‰).

Die vorstehenden Angaben werden zur vollständigen Beschreibung der in den Kulturen beobachteten Phänomene gemacht. Das Auftreten dieser Zellstadien - bei auto-

tropher, mixotropher wie heterotropher Anzucht gleichermaßen vorkommend - blieb aber ohne Einfluß auf das Wachstum der Kulturen.

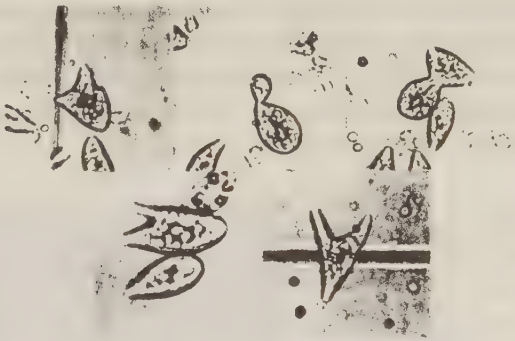


Abb. 3 Von der üblichen Form stark abweichende Zellen von Chlorogonium elongatum St.16

Vergrößerung ca. 750 fach

5. Bestimmungsmethoden

Zur Bestimmung der Dichte der Kulturen wurde die Trübung bei 1 000 nm und 1 cm Schichtdicke im ZEISS Spektralphotometer PMQ II gemessen.

Trockengewichtsbestimmungen erfolgten in gewichtskonstanten Tiegeln aus Aluminiumfolie bei 105°C (KOWALLIK, 1962).

Der Gesamtstickstoff wurde nach der Mikrokjeldahlmethode als Ammoniak durch Titration mit n/200 Schwefelsäure (vgl. BRADSTREET, 1965) bestimmt; 1 ml verbrauchte n/200 Schwefelsäure entspricht dabei 70 µg Stickstoff.

Der Gesamtproteinstickstoff wurde nach 30 Min. Extraktion der Algen bei 0°C in 5%iger TCA im unlöslichen Anteil gemessen.

Pufferlöslicher Proteinstickstoff wurde nach Fällung mit TCA (Endkonzentration 10%) im zellfreien Extrakt über Nacht in der Kälte und einmaligem Waschen mit 2%iger TCA erfaßt.

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte weitgehend nach den Angaben von BÖGER (1964). Das Gesamtchlorophyll wurde aus dem Zentrifugat der Zellen nach kräftigem Durchmischen mit 96%igem Methanol im Dunkeln 10 Min. lang bei Raumtemperatur extrahiert und im Überstand der Chlorophyllgehalt aus den photometrischen Messungen bei 650 und 665 nm nach MACKINNEY (1941) bestimmt (vgl. auch COMAR und ZSCHEILE, 1942).

Der Kohlenhydratgehalt (einschließlich der Polysaccharide) wurde mit der Anthron-Methode in Anlehnung an ROE (1955) photometrisch bei 620 nm gemessen; dabei wurde einer Extinktion von 0,675 ein Kohlenhydratgehalt von 100 µg/ml Suspension zugrunde gelegt.

Da Zellzählungen mit der Zählkammer nach THOMA (neu) für Chlorogonium ungenaue Ergebnisse erbrachten, die auf das ungünstige Verhältnis zwischen der Größe der Zellen und der Zählfläche bzw. des Volumens zurückzuführen sind, wurde in Zählkammern nach FUCHS-ROSENTHAL (Tiefe 0,200 mm) - hergestellt von den Firmen ASSISTENT oder RESISTANCE - gezählt.

Für Zellzählungen wurden die beweglichen Zellen mit 0,05 ml Jodjodkalium-Lösung je Zählprobe (jeweils 10 ml Kultursuspension) behandelt. Die Auszählungen der Algen erfolgten nach zweiminütigem Sedimentieren in 10-20 Parallelen je Probe (je nach Zelldichte), wodurch die Abweichungen der Einzelzählungen vom Durchschnittswert auf 2-5% reduziert werden konnten (vgl. MATTERN, referiert bei BECHER, SCHNEIDERMANN und WILLIAMS, 1956; WANKA, 1959).

Bei den aufgeführten Versuchen beschränkte sich die Angabe der Zellzahl auf die relative Zellzahl (RZZ) als Vergleichsgröße.

Färbungen der Zellkerne wurden im Prinzip nach der Giemsa-Methode (DARLINGTON und LA COUR, 1963; RUTHMANN, 1966) durchgeführt, jedoch mußte diese entsprechend modifiziert werden; Detailangaben zur Färbemethode im Text (S. 50).

Die Atmung wurde als Sauerstoffaufnahme mit einer Elektrode (polarographische Sauerstoffmessung) bestimmt, die an das Meßgerät Biological Oxygen Monitor (Model 53) der Firma YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS angeschlossen war. Die Algenproben (5 ml) wurden in eine Plexiglasküvette gegeben, die durch ihren sie umgebenden Wassermantel konstant auf 32°C temperiert werden konnte; in der Meßküvette wurden die Suspensionen von einem Magnetrührer ständig durchmischt; dadurch wurde das Absetzen der Algen verhindert und ein gleichmäßiger Sauerstoffaustausch an der Teflon-Membran der Elektrode sichergestellt. Die Küvette wurde mit der einschraubbaren Elektrode luftdicht und blasenfrei verschlossen. Die im abgeschlossen Volumen durch Atmung verursachte Sauerstoffabnahme wurde jeweils nach dreiminütiger Temperaturangleichung 10 Min. lang über ein mit dem Monitor gekoppeltes Registriergerät (SERVOGOR, Metrawatt) aufgezeichnet. Die Empfindlichkeitseichung wurde über die Messung luftgesättigten Wassers durchgeführt (TRUESDALE et al., 1955). Der Salzgehalt der verwendeten Nährlösung ist mit 2‰ so gering, daß er im vorliegenden Fall kaum eine Verringerung der Löslichkeit des Sauerstoffs bewirkt.

Die Bestimmung der Nucleinsäuren, insbesondere der DNA, erfolgte aus Vergleichsgründen nach verschiedenen Angaben. Diese Bestimmungen wurden an frischem nicht zertrümmertem Material durchgeführt; hierbei wurde von der Erfahrung ausgegangen, daß die Nucleinsäureanalysen an intakten, frischen Zellen und an Zellhomogenaten bei Chlorogonium - unter Anwendung derselben Methode - übereinstimmende Werte ergaben. Die getrennte Extraktion der DNA und der RNA mit Perchlorsäure in einer modifizierten Methode nach OGUR und ROSEN (1950) ist ebenso wie die colorimetrische Bestimmung beider Nucleinsäuren mit Indol (vgl. CERIOTTI, 1952) - welche nach einem Vorschlag von KECK (1956) leicht abgewandelt wurde - und Orcin (CERIOTTI, 1955) eingehend bei RUPPEL (1962) beschrieben.

Die Bestimmung der Nucleinsäuren aus einem Gesamtextrakt erfolgte in einer modifizierten Methode nach WANKA (1962 b). 20(-40) ml Algensuspension wurden 15 Min. bei 6 000 g abzentrifugiert und die Zellen zweimal je 30 Min. mit 0,2 n Perchlorsäure in 50%igem Äthanol bei Zimmertemperatur und darauf dreimal je 10 Min. mit siedendem Äthanol-Äther (3:1) vorextrahiert (jeweils 4 ml Extraktionsmedium). Nach einmaligem Waschen der Zellen mit 96%igem Äthanol (15 Min. Zentrifugation bei 6 000 g) wurden DNA und RNA 6 Std. lang mit 8 ml 0,5 n Perchlorsäure bei 45°C extrahiert (WANKA, 1962 a). Der Extrakt diente als Ausgangslösung für die colorimetrischen Bestimmungen der DNA und RNA mit Indol bzw. Orcin (CERIOTTI, 1952; 1955); die Bestimmung der DNA mit der Diphenylaminreaktion nach BURTON (1956) brachte keine befriedigenden Ergebnisse.

Die Isolierung der DNA aus homogenisierten Chlorogonium-Zellen erfolgte mit der Phenol-(Kresol-)Methode im Prinzip nach RICHTER und SENGER (1964). Als Ausgangsmaterial je Probe dienten 150 ml Chlorogonium-Suspension der optischen Dichte E_{1000} = 0,55-0,65, die bei 6 000 g abzentrifugiert (5 Min.), anschließend einmal gewaschen und mit Quarzpulver ("Quarz, gewaschen und geglüht", MERCK 7530, wurde vor Gebrauch pulverisiert) in der Kälte im Mörser unter Zugabe von wenig Puffer (0,05 M TRIS·HCl, pH 7,6 + 0,01 M $MgSO_4$) 3 Min. homogenisiert wurden; dann wurde das Homogenat mit einem gleichgroßen Volumen wassergesättigten Phenol-Kresols (50:7, vgl. LOENING, 1969) für 15 Min. von Hand gerührt; durch Zentrifugation (5 Min. bei 6 000 g) und anschließendem Abhebern wurde die wäßrige Phase getrennt, die Phenolphase darauf zweimal mit 0,05 M TRIS-Puffer von pH 7,5 bzw. 9,0 extrahiert. In den vereinigten wäßrigen Phasen erfolgte dann die Ausfällung der Gesamtnucleinsäuren mit der dreifachen Menge Äthanol unter Zugabe eines Zehntels des Volumens einer 20%igen Lösung von Natriumacetat (nach LOENING, 1969) bei -20°C

über Nacht; die gefällten Nucleinsäuren wurden hochtourig zentrifugiert und zweimal mit 96%igem Äthanol gewaschen. Der gelatinöse Niederschlag wurde sodann in 5 ml 0,5 n NaOH vollständig gelöst und die alkalische Lösung sodann für 16 Stunden bei 37°C hydrolysiert (vgl. RUPPEL und VAN WYK, 1965); dabei spaltet die RNA in Ribonucleotide auf, die DNA bleibt hochmolekular. Nach erfolgter alkalischer Hydrolyse wurde das Hydrolysat mit 5,5 ml 96%igem Äthanol p.a., der 0,45 ml Eisessig enthält, versetzt (Mengen präzise einhalten!). Dabei fiel die DNA als weißes Sediment aus, wurde scharf abzentrifugiert und nacheinander mit 70, 80 und 96%igem p.a.-Äthanol sowie wasserfreiem Äther gewaschen. Das Sediment war nach kurzer Zeit trocken und konnte für die UV-Messung in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,6 + 0,2 M NaCl) als Lösungsmittel aufgenommen werden. Die Messungen erfolgten bei 260 nm gegen eine Blindprobe.

6. Enzymuntersuchungen

Je nach Dichte der Algen wurden 200-600 ml Suspension 5 Min. bei 2 500 g abzentrifugiert und die Algen mit eiskaltem Wasser und anschließend mit eiskaltem TRIS-HCl (0,05 M, pH 7,6) gewaschen. Mit wenig TRIS-Puffer (0,05 M, pH 7,6) wurden sie in einen vorgekühlten Mörser überführt und 6 Min. in der Kälte mit Seesand ("Seesand mit Säure gereinigt und geglüht", MERCK 7712) zerrieben+. Das Homogenat wurde mit 3-4 ml TRIS-Puffer (s.o.) verdünnt und auf der Kühlzentrifuge UNIVERSAL RAPID der Firma CHRIST 20 Min. bei 40 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand (Rohextrakt) wurde nach Vorreinigung (s.u.) zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und des Extrakt-Proteins verwendet. Die Proteinwerte wurden nach einer modifizierten Folin-Phenol-Methode (mit Folin-

+ andere Aufschlußmethoden erwiesen sich als weniger geeignet (vgl. STABENAU, 1969)

Ciocalteus Phenolreagenz MERCK 9001) nach LOWRY et al. (1951) bei 750 nm colorimetrisch ermittelt; als Eichstandard diente Rinderserumalbumin.
Die Aktivität wurde bei allen Enzymen meist in einem Extrakt getestet, der durch Gelfiltration mit SEPHADEX G-25 medium (Säule 1,6 x 16 cm) gereinigt worden war. Dadurch sollte eine Veränderung der spezifischen Aktivität durch etwa vorhandene Hemmstoffe verhindert werden. Andererseits war immer dann eine Vorreinigung angezeigt, wenn der Extrakt auch für gelelektrophoretische Zwecke verwendet wurde. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Gerät CHROMOSCAN der Firma JOYCE-LOEBL (ohne Filter/CAM D); die Gelelektrophorese ist von KERSTEN (unveröffentlicht) unter anderem nach den Grundlagen von DAVIS (1964) und ORNSTEIN (1964) für Chlorogonium erarbeitet worden.
Die Aktivitäten der Enzyme wurden an Hand des optischen Tests nach WARBURG im Photometer EPPENDORF bei 366 nm gemessen. Die Messungen wurden in Küvetten von 1 cm Schichtdicke vorgenommen. Die Proben wurden während der Vorinkubation (in der Regel 5 Min.) und während des Tests temperaturkonstant (25°C) gehalten. Die spezifische Aktivitäten werden angegeben als Umsatz von 0,1 µMol Substrat pro Minute, bezogen auf mg/ml Extraktprotein (vgl. BERGER, 1964).

Testansätze:
(Nomenklatur nach BARMAN, 1969)

5-Dehydroxyshikimisäure-Reduktase
(1.1.1.25 Shikimate:NADP oxidoreductase)
Test modifiziert nach FEIERABEND (1965)

2,45 ml TRIS·HCl 0,05 M pH 7,6
0,20 ml EDTA·KOH 0,1 M pH 7,6
0,10 ml $NADP^+$ 20 mg/ml
0,05 ml H_2O
0,10 ml Extrakt
0,10 ml Shikimisäure 0,01 M zum Start

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
(1.1.1.49 D-glucose-6-phosphate:NADP oxidoreductase)
Test modifiziert nach WIESSNER (1963) und BOEHRINGER BIOCHEMICAKATALOG ENZYME (1970)

2,54 ml TEA 0,05 M pH 8,5
0,01 ml H_2O
0,20 ml $MgCl_2$ 0,1 M
0,10 ml $NADP^+$ 10 mg/ml
0,05 ml Extrakt
0,10 ml G6P (di-Na-Salz) 10 mg/ml zum Start

Isocitrat-Dehydrogenase
(1.1.1.41 threo-Ds-isocitrate:NAD oxidoreductase (decarboxylating) bzw.
1.1.1.42 threo-Ds-isocitrate:NADP oxidoreductase (decarboxylating))

Test modifiziert nach WIESSNER (1963) und BOEHRINGER BIOCHEMICAKATALOG ENZYME (1970)

(in Klammern Änderungen des Testansatzes für das $NADP^+$ - umsetzende Enzym)

2,60 (2,64) ml TRIS·HCl 0,05 M pH 7,6
- (0,05) ml H_2O
0,10 ml $MgCl_2$ 0,1 M
0,10 ml NAD^+ bzw. $NADP^+$ 10 mg/ml
0,10 (0,01) ml Extrakt
0,10 ml DL-Isocitronensäure (tri-Na-Salz)
4 mg/ml Puffer zum Start

6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase
(1.1.1.43 6-phospho-D-gluconate:NADP oxidoreductase)
Test modifiziert nach BOEHRINGER BIOCHEMICAKATALOG ENZYME (1970)

2,54 ml TEA 0,05 M pH 8,5
0,01 ml H_2O
0,20 $MgCl_2$ 0,1 M
0,10 $NADP^+$ 10 mg/ml
0,05 ml Extrakt
0,10 ml Gluconsäure (tri-Na-Salz) 10 mg/ml zum Start

Sämtliche Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

7. Chemikalien

Zur Herstellung der Nährlösungen wurden p.a.-Chemikalien von MERCK, Darmstadt, verwendet; dieselbe Firma lieferte auch DNA, RNA, Diphenylamin, Fluorescein, Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, TCA und Asparaginsäure. Benzyladenin, Rinderserumalbumin (COHN Fraktion V) und Vinblastin (Vincaleukoblastin) wurden von SCHUCHARDT, München, bezogen; cAMP, Adenin, Cytosin, Guanin, Kinetin und Thymin stammten aus dem SERVA-Entwicklungslabor Heidelberg; bei den Enzymtests wurden die meisten Feinchemikalien von der BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Mannheim, verwendet, ebenso AMP, ADP und ATP. Isocitrat und Shikimisäure kamen von ROTH, Karlsruhe; TRIS wurde hergestellt von SIGMA, St. Louis, Missouri und Sephadex G-25 von PHARMACIA, Uppsala, Schweden.
DCMU (pure Diuron) wurde vom Versuchslabor E.J. DUPONT DE NEMOURS & CO (INC.), Industrial and Biochemicals Dept., Wilmington, Del. zur Verfügung gestellt.

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. Versuche zur Synchronisierung

Unter Synchronisation versteht man die experimentell erlangte Koordination individueller Lebenszyklen in einer Population von Zellen. In einer Synchronkultur liegen also - als Folge bestimmter experimenteller Eingriffe - alle Zellen jeweils in nahezu gleichem Entwicklungsstadium vor, und die Zellteilung wird von allen Zellen innerhalb einer sehr begrenzten Zeit durchlaufen.
Bisher ist bereits für eine größere Zahl von einzelligen Algen mit unterschiedlichen Methoden eine Synchronisierung erreicht worden. Neuere zusammenfassende Berichte liegen von PIRSON und LORENZEN (1966) und LORENZEN (1970) vor.
Meist kann eine Synchronisation durch längerdauernde periodische Wechsel von Außeneinflüssen erzielt und aufrechterhalten werden, wobei für photoautotrophe Zellen in erster Linie ein Licht-Dunkel-Wechsel in Betracht kommt (LORENZEN, 1957).

1. Der Einfluß von Licht-Dunkel-Wechseln

Zunächst wurde eine Synchronisierung auf Grund der Ergebnisse von LORENZEN (1957) sowie LORENZEN und RUPPEL (1960) erprobt (vgl. auch PIRSON, LORENZEN und RUPPEL, 1963).
In Anlehnung an die bei der Synchronisation von Chlorella bewährte Methode wurde zuerst versucht, aus dem kürzestmöglichen Entwicklungsablauf (Generationsdauer) einer Chlorogonium-Zelle eine für die Synchronisierung günstige Periodenlänge des Licht-Dunkel-Wechsels zu er-

mitteln. Als Generationsdauer wird dabei der Zeitraum der Zellentwicklung zwischen zwei aufeinanderfolgenden, tatsächlich beobachteten Zellteilungen, d.h. Zoosporenfreisetzungen, bezeichnet. Steht die Periodenlänge eines Licht-Dunkel-Wechsels in einem günstigen Verhältnis zum kürzestmöglichen Entwicklungsablauf eines Organismus, so läßt sich - wenn nicht noch weitere Voraussetzungen erfüllt werden müssen - bei bestimmten Licht- und Temperaturverhältnissen und regelmäßiger Verdünnung der Algensuspension auf eine konstante Ausgangszellzahl (LORENZEN, 1957) eine komplette und langandauernde Synchronisation erreichen.

Die auf Grund von Wachstumsbeobachtungen bei photoautotrophen Chlorogonium-Zellen im Dauerlicht (rein theoretisch) berechnete Generationsdauer, ausgehend von der Verdopplungszeit (also der Zeit, die von den Zellen benötigt wird, um sich einmal zu verdoppeln; vgl. SOROKIN und KRAUSS, 1959) - bei STABENAU (1969) für Chlorogonium elongatum mit 3,64 Stunden angegeben - ließ sich in der experimentellen Praxis nicht ohne weiteres anwenden; die Ursache dürfte in den Teilungsvorgängen bei Chlorogonium elongatum zu suchen sein. Ein Vergleich zwischen der Zahl der Zoosporen, die in einer Dauerlichtkultur (2,4,6 und 8) und einer im Licht-Dunkel-Wechsel wachsenden Kultur (zwischen 4 und 8) aus einer Zoosporenmutterzelle durch Teilung hervorgehen können, zeigt, daß selbst im letzteren Fall noch erhebliche Schwankungen auftreten; eine ausgesprochen bevorzugte Zoosporenzahl war demnach nicht festzustellen; damit sind die Teilungsverhältnisse weniger übersichtlich wie bei in Licht-Dunkel-Wechseln synchronisierten Chlorellen, wo aus den Autosporenmutterzellen je nach den experimentellen Außenbedingungen (Temperatur, Beleuchtungsverhältnisse, Belichtungszeit) mehr oder weniger konstante Autosporenzahlen freigesetzt werden (PIRSON, LORENZEN und RUPPEL, 1963; LORENZEN, 1963). Als Anhaltspunkt kann man jedoch für Chlorogonium elongatum (unter

den hier gewählten Bedingungen des LDW) die durchschnittlich freigesetzte Zoosporenzahl mit ungefähr 6 angeben. Der Entwicklungsablauf (Generationsdauer) einer Chlorogonium-Zelle vollzieht sich demnach innerhalb von 9-14 Stunden.

Nach eingehenden Vorversuchen im Dauerlicht wächst Chlorogonium elongatum Stamm 16 bei einer Temperatur von 32°C und einer Beleuchtungsstärke von 12 000 Lux unter ausschließlicher Verwendung von Warmton-Leuchtstoffröhren am besten (gemessen an der Trockengewichtsproduktion ergab sich eine Erhöhung um 20-25% gegenüber 30°C, Beleuchtungsstärke 9 000 Lux Mischlicht), vgl. Abb. 4; daher wurden

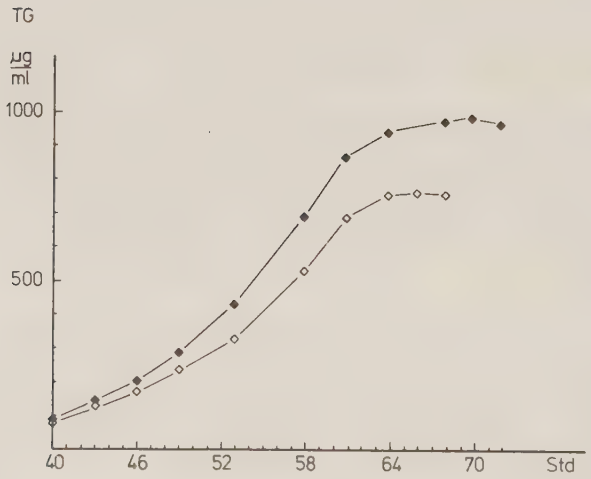


Abb. 4 Vergleich der Trockengewichtsproduktionen
◇—◇ 9000 Lux Mischlicht, 30°C
◆—◆ 12000 Lux Warmtonlicht, 32°C

die Synchronisierungsversuche, soweit nicht anders angegeben, unter diesen Kulturbedingungen durchgeführt.

Als Maß für die jeweils erreichte Synchronisation diente die Zahl der (maximal) gleichzeitig auftretenden Teilungsstadien (Zoosporenmutterzellen). Die Anzahl der Zoosporenmutterzellen wurde in Prozent (%) der Gesamtzahl der Organismen ausgedrückt. Die relative Zellzahl (RZZ) konnte wegen der unübersichtlichen Teilungssituation bei Chlorogonium nicht als Maßstab für den Grad der Synchronisation verwendet werden. Bei einer Kultur im Licht-Dunkel-Wechsel erwies sich entsprechend den Verhältnissen bei den Kulturen von Chlorella eine regelmäßige Verdünnung der Algenkulturen (LORENZEN, 1957) als notwendig. Die bei jeder Verdünnung einzustellende konstante Ausgangszellzahl wurde durch orientierende Vergleiche mit Chlorella-Kulturen gefunden; diesen Ergebnissen zufolge wurde je nach Länge der Lichtzeit auf die konstanten relativen Zellzahlen 500 oder 750 (Zählkammer nach FUCHS-ROSENTHAL) verdünnt. Der Zeitpunkt der Verdünnungen hatte bei Testversuchen, in denen einmal am Ende einer Lichtzeit, das andere Mal am Ende einer Dunkelzeit verdünnt worden war, keinen wesentlichen Einfluß auf die Höhe der Teilungsschübe (vgl. LORENZEN, 1957; PIRSON und RUPPEL, 1962). Die Ergebnisse überschritten die allgemein zu erwartenden physiologisch bedingten Schwankungen nicht. Als fixer Zeitpunkt für die Verdünnungen wurde das Ende einer jeden Dunkelzeit gewählt; die Verdünnung auf die konstante Zellzahl (die der Ausgangsdichte ungefähr entspricht) wurde mit frischer Nährlösung vorgenommen, deren Temperatur - um physiologische Schocks auszuschließen - der Wachstumstemperatur der Kulturen angeglichen war.

Für die ersten Synchronisierungsversuche wurden Licht-Dunkel-Wechsel gewählt, deren Zykluslängen ungefähr auf die Generationsdauer der Zellen (9-14 Stunden) abgestimmt wurden.

Eine Vollsynchronisation wurde bei keinem dieser Licht-Dunkel-Wechsel erreicht; daher kann die Besprechung dieser Versuche auf die LDW 6:$\overline{3}$, 6:$\overline{4}$ und 6:$\overline{6}$ beschränkt werden, da bei ihnen die Anhäufung von Zoosporenmutterzellen (Teilungsstadien) und die anschließende Zoosporenfreisetzung (Teilungsschub) in der Lichtzeit am deutlichsten ausgeprägt war.

Nach drei bis vier 6:$\overline{3}$-Licht-Dunkel-Wechseln kam es in den jeweiligen Lichtzeiten zu Anhäufungen von Teilungsstadien, die in ihrer Höhe alternierend zwischen 15-30 und 40-49% schwankten (Abb. 5). Diese maximale Anhäufung wurde in der Regel drei bis dreieinhalb Stunden

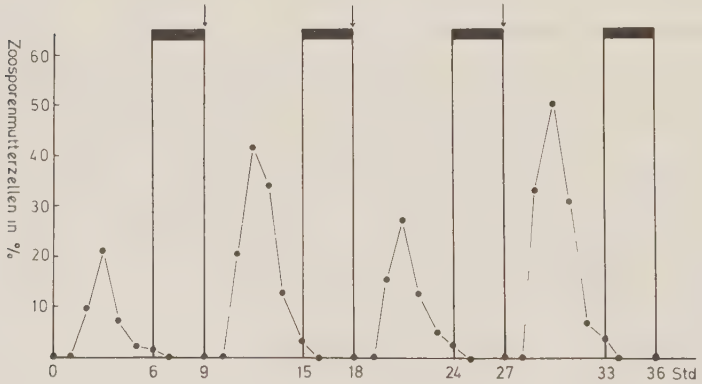


Abb. 5 Verteilung der Teilungsstadien im Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{3}$
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

nach Lichteinsatz erreicht. Die anschließende Zoosporenfreisetzung erfolgte ebenfalls im Licht. Zu Beginn der Dunkelzeiten waren kaum noch Zoosporenmutterzellen aufzufinden.

Der Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{4}$ erbrachte gegenüber dem Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{3}$ mit maximalen Teilungsschüben bis zu 55% eine durchschnittliche Steigerung von 10% (Abb. 6).

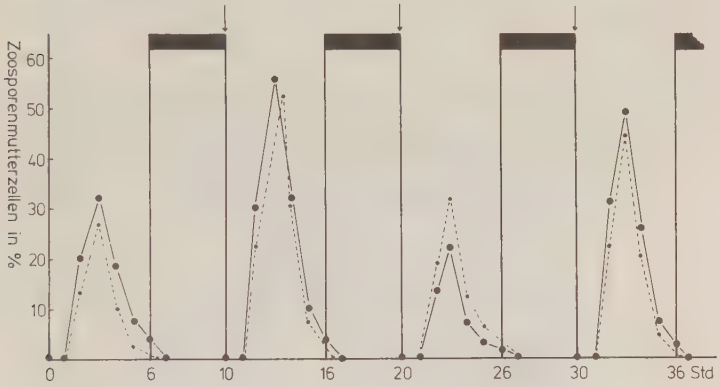


Abb. 6 Verteilung der Teilungsstadien im Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{4}$
●——● 9000 Lux, o---o 16000 Lux
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

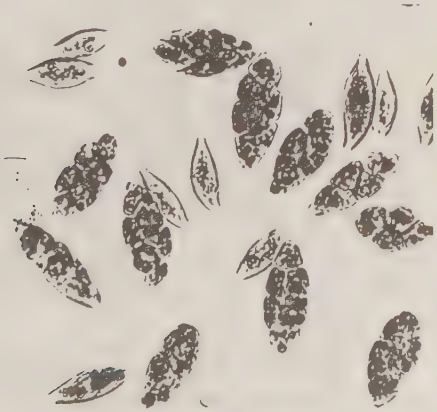


Abb. 7 Maximale Anhäufung von Teilungsstadien (ca.50%) bei Chlorogonium elongatum St.16 während der Lichtzeit im LDW 6:$\overline{4}$

Die Photographie in Abb. 7 zeigt die maximale Anhäufung der Zoosporenmutterzellen in der Lichtzeit (LDW 6:$\overline{4}$). In den Abbildungen 8 a (Übersicht) und 8 b (Detail) sind Zellen in der Mitte bzw. am Ende einer Dunkelzeit wiedergegeben, d.h. zu einem Zeitpunkt, in dem keinerlei Teilungsstadien aufzufinden sind (LDW 6:$\overline{4}$).

a

b

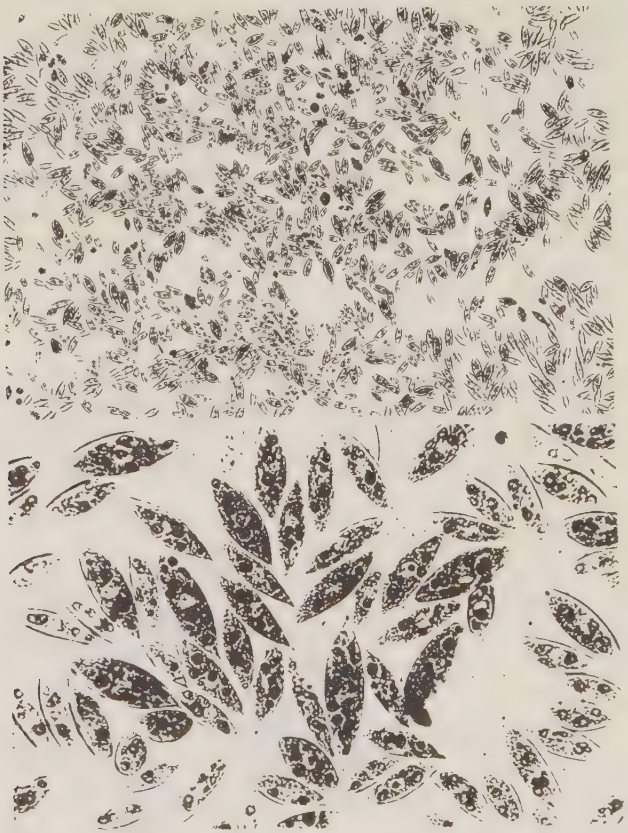


Abb. 8 Chlorogonium-Zellen in der Dunkelzeit im LDW 6:$\overline{4}$; es treten keine Teilungsstadien und keinerlei Zellteilungen auf.

a Übersicht (Vergrößerung ca. 150 fach)

b Detail (Vergrößerung ca. 850 fach)

Ein signifikanter Einfluß unterschiedlicher Beleuchtungsstärken auf die Höhe der Teilungsschübe bzw. auf die Zahl der maximal gleichzeitig auftretenden Teilungsstadien (vgl. 6:$\overline{4}$-Licht-Dunkel-Wechsel-Versuche bei 9 000 und 16 000 Lux/32°C in Abb. 6, S. 25) ließ sich nicht nachweisen.

Im Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$ war der prozentuale Gehalt an Zoosporenmutterzellen unmittelbar vor dem Zeitpunkt des maximalen Teilungsschubes mit 10-25 und 45-65% am höchsten (Abb. 9).

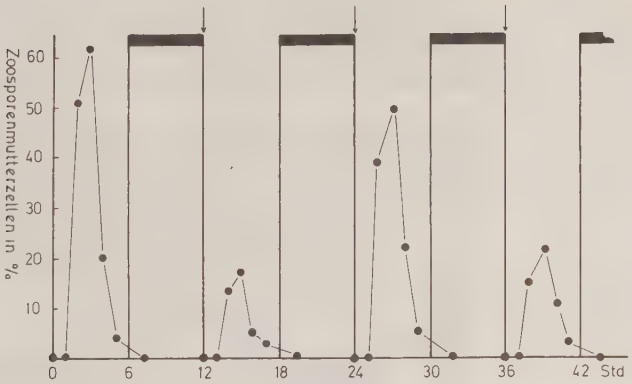


Abb. 9 Verteilung der Teilungsstadien im Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

Die Photographien in Abb. 10 geben die maximale Anhäufung von Zoosporenmutterzellen in der Lichtzeit im Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$ vor der einsetzenden Zoosporenfreisetzung wieder.

Der Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$ erwies sich mit den alternierend schwächeren und stärkeren Häufungen von Teilungsstadien (Zoosporenmutterzellen) in den Licht-

a

b

Abb. 10 Maximale Anhäufung der Teilungsstadien bzw. Zoosporenmutterzellen (> 60%) in der Lichtzeit des LDWs 6:$\overline{6}$ unmittelbar vor der beginnenden Freisetzung der Zoosporen.

a Übersicht (Vergrößerung ca. 150 fach)

b Detail (Vergrößerung ca. 750 fach)

zeiten damit als günstigste Zykluslänge (12 Stunden), ohne daß jedoch eine Vollsynchronisation zu erreichen war. Die Teilungsschübe beschränkten sich ausschließlich auf die Lichtzeit; nur diejenigen Zellen, die schon unmittelbar vor der Freisetzung ihrer Zoosporen standen, schlossen diese im Dunkeln ab, was durch Kontrollzählungen und Beobachtungen im Abstand von 30 Minuten belegt werden konnte. Im weiteren Verlauf der Dunkelzeit traten keine neuen Zoosporenmutterzellen bzw. Zellteilungen auf.

Verkürzungen der Zykluslänge (< 12 Stunden) erbrachten geringere Teilungsschübe. Dieses Ergebnis, das auch schon in den Versuchen 6:$\overline{3}$ und 6:$\overline{4}$ (Abb. 5 und 6, S. 24 u. 25) angedeutet wurde, ließ sich durch die in den Abbildungen 11 und 12 dargestellten Licht-Dunkel-Wechsel-Versuche 5:$\overline{4}$ und 5:$\overline{2}$ mit Teilungsschüben zwischen 10 und 30 bzw. 9 und 22% bestätigen.

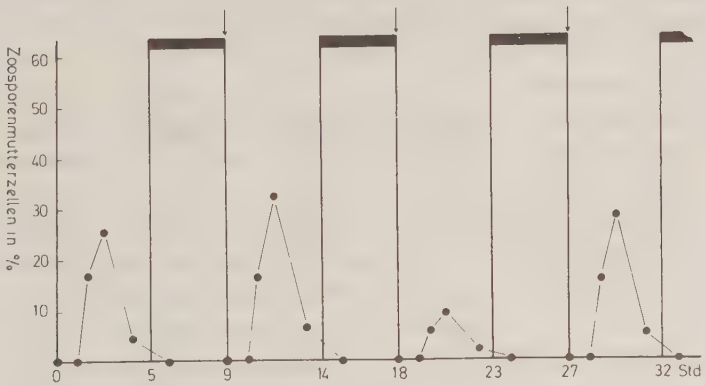


Abb. 11 Verteilung der Teilungsstadien im Licht-Dunkel-Wechsel 5:$\overline{4}$
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

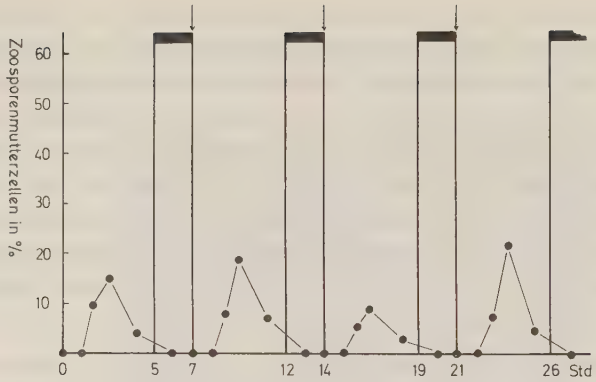


Abb. 12 Verteilung der Teilungsstadien im Licht-Dunkel-Wechsel 5:$\overline{2}$
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

Auch eine Verlängerung des Zyklus (> 12 Stunden) ließ die Zahl der teilungsbereiten Zoosporenmutterzellen im Vergleich zu den 6:$\overline{6}$-Licht-Dunkel-Wechseln merklich absinken. Der 12:$\overline{6}$-LDW ergab nur Anhäufungen der Teilungsstadien zwischen 5 und 20% (Abb. 13).

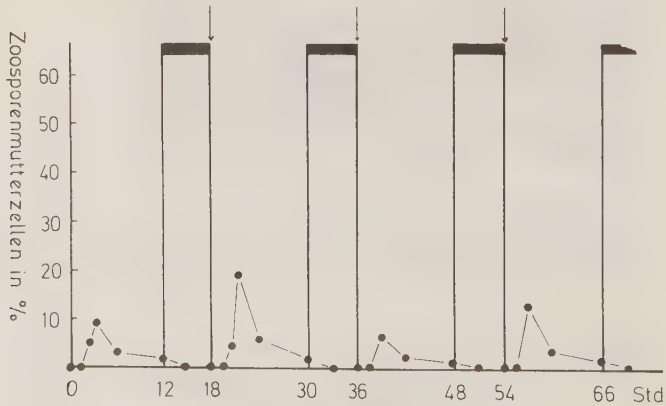


Abb. 13 Verteilung der Teilungsstadien im Licht-Dunkel-Wechsel 12:$\overline{6}$
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

Die in enger Anlehnung an die bei Chlorella synchronisierenden Licht-Dunkel-Wechsel 16:$\overline{12}$ und 12:$\overline{16}$ (Zykluslänge 28 Stunden) sowie 14:$\overline{10}$ und 10:$\overline{14}$ (Zykluslänge 24 Stunden und somit circadian) bei Chlorogonium elongatum durchgeführten Synchronisationsversuche gaben ebenfalls keinerlei Hinweise für eine auch nur annähernd vollständige Synchronisation (vgl. auch Abb. 15).

Insgesamt wurden die synchronisierenden Wirkungen folgender Licht-Dunkel-Wechsel untersucht:

4:$\overline{3}$	3:$\overline{5}$	5:$\overline{4}$	4:$\overline{6}$	6:$\overline{6}$	6:$\overline{8}$	8:$\overline{10}$	8:$\overline{12}$	4:$\overline{20}$	12:$\overline{16}$
5:$\overline{2}$	5:$\overline{3}$	6:$\overline{3}$	6:$\overline{4}$	8:$\overline{4}$	8:$\overline{6}$	12:$\overline{6}$		5:$\overline{19}$	16:$\overline{12}$
								8:$\overline{16}$	
								10:$\overline{14}$	
								14:$\overline{10}$	

Als Ergebnis dieser Versuchsreihen - zu denen aus Vergleichsgründen auch die Stämme 1 E, 2 E und 17 herangezogen wurden - kann festgestellt werden, daß bei Chlorogonium elongatum sämtliche unter photoautotrophen Bedingungen erprobten Licht-Dunkel-Wechsel nicht zu einer Vollsynchronisation führten; einen Hinweis für eventuell auftretende "Zwischenteilungen" (wie sie SCHLÖSSER 1966 bei Chlamydomonas in der Lichtzeit des synchronisierenden Licht-Dunkel-Wechsels 12:$\overline{12}$ bei zu niedriger Wachstumstemperatur fand), die die Synchronisierung stören, gab es nicht. Auch asymmetrische (inäquale) Teilungen, wie sie MITCHISON und WILCOX (1972) bei Anabaena catenula beschrieben und die Ursache für das Ausbleiben einer Vollsynchronisation sein könnten, waren bei Chlorogonium elongatum nicht festzustellen.
Die photoautotroph ernährten Zellen ließen allerdings eine "Rhythmik" erkennen, die sich in einer unterschiedlich hohen Anhäufung der Zoosporenmutterzellen[+] in den

[+] obwohl die Versuche in sehr verschiedenen Zeitvarianten durchgeführt wurden, gab es keine unmittelbaren Anhaltspunkte für den Einfluß eines endodiurnalen (circadianen) Aktivitätswechsels als Ursache für die (ungleichen) Schübe (vgl. LORENZEN und HESSE, 1968; HESSE, 1972).

Lichtzeiten äußerte und beim Zyklus 6:6 am ausgeprägtesten war. Das hierbei zu beobachtende Alternieren hoher und niedriger Teilungsschübe beschrieben bereits LORENZEN (1957), WANKA (1959) und PIRSON und SENGER (1961); sie schlossen auf das Vorhandensein synchroner Zellgruppen ("Gruppensynchronisation"). Gruppensynchrone Chlorella-Kulturen können bei Steigerung des Lichtgenusses in vollsynchrone Kulturen übergehen (SENGER, 1961). Bei Chlorogonium ließ sich auf diese Weise keine vollsynchrone Kultur erreichen; eine Änderung der Beleuchtungsstärke beeinflußte die wechselnde Höhe der Teilungsschübe im Licht nicht (vgl. Abb. 6, S. 25). Eine "Teilsynchronisierung" (SENGER, 1961) ist aber auszuschließen, denn bei ihr fehlt das Alternieren der Schubhöhen: Der Anteil der Zellen mit verlängerten Entwicklungszyklen - wie sie z.B. durch Temperaturerniedrigung auftreten können - bleibt gleich, und so ergibt sich eine konstante, zur gegebenen Teilungszeit gleiche Höhe der Teilungsschübe.
Die Anhäufung der Zoosporenmutterzellen bzw. die Teilungsmaxima lagen grundsätzlich im Licht, ähnlich wie es VON DENFFER (1950) bei Zweiteilung der Diatomee Nitzschia palea gefunden hat. Im Dunkeln teilten sich autotroph ernährte Chlorogonium-Zellen nicht und bildeten keine Zoosporenmutterzellen mehr.

Die Inhomogenität des Zellmaterials, die auch in den morphologischen Größenunterschieden zwischen den Zellen in einer Kultur zum Ausdruck kommt, hängt vermutlich stark vom Grad der Streuung des physiologischen Zustandes des Ausgangsmaterials ab; um diese zu verringern, wurde die schon bei TAMIYA et al. (1953) als ergänzende Methodik zur Synchronisation beschriebene Trennung jüngerer und älterer Entwicklungsstadien durch fraktionierende Zentrifugation schonend bei 300/400/500 g in einer STOCK-Zentrifuge versucht. Eine Trennung der morphologisch unterschiedlichen Zellen war jedoch nicht zu er-

reichen. Auch eine mechanische Trennung verschieden großer (bzw. alter) Zellen durch Filtration (mit Glasfiltern der Firma SCHOTT, Porosität 2: 40-90 µ, Porosität 3: 15-40 µ und Porosität 4: 9-15 µ sowie diversen Papierfiltern) erwies sich als unbrauchbar. Die Größenschwankungen auch innerhalb von Zellgruppen gleicher physiologischer Zustände sind wahrscheinlich zu groß. Eine Trennung der Zellgruppen durch Sedimentation war nicht zu erzielen; sowohl im Sediment wie auch in verschiedenen Bereichen des Überstandes befanden sich die unterschiedlichsten Zelltypen. Der Grund dürfte die Beweglichkeit aller Stadien sein.
Topische Phototaxis (HAUPT, 1959) wurde bei Einzellern wiederholt beschrieben, so etwa von MAINX (1929) für Haematococcus und Chlorogonium sowie von HALLDAL (1958) für die von ihm untersuchten Volvocales. Die verschiedenen Entwicklungsstadien (jüngere und ältere Zellen, Teilungsstadien) reagierten jedoch nicht mit unterschiedlichen Richtungsbewegungen auf einseitig einfallendes Licht, so daß sich auch auf diesem Wege kein homogenes Material für eine anschließende Synchronkultur gewinnen ließ.
Auch Erhöhungen der Kulturtemperatur und deren Verringerung beeinflußten den Grad der Streuung der einzelnen Entwicklungsstadien nicht.

2. Der Einfluß von Temperaturwechseln

Nachdem die bisher aufgeführten Versuche keine brauchbare Synchronisierungsmethode lieferten, wurde im folgenden als synchronisierendes Prinzip der Temperaturwechsel (vgl. LORENZEN und VENKATARAMAN, 1969, bei Anacystis = Lauterbornia und ROONEY, YEN, MIKITA, 1971, bei Chlamydomonas) gewählt. Dabei wechselte die Kältephase mit der Wärmephase im 6stündigen Abstand unter Dauerlichtgenuß (12 000 Lux Warmtonlicht) ab; drei Temperaturwechsel wurden ausführlich untersucht: 25/32°C, 28/32°C und 32/40°C.

Während der Wechsel 25/32°C bei den Kulturen nach drei bis vier Zyklen zu starken Wachstumsstörungen führte (Gelbwerden der Kulturen bis zum Absterben), war bei den anderen Temperaturwechseln kein nachteiliger Einfluß feststellbar; jedoch kam es nicht zu Anhäufungen von Teilungsstadien.

3. Einfluß der Kombination von Licht-Dunkel-Wechsel mit Temperaturwechsel

Zur Erarbeitung einer Synchronisationsmethode wurden als nächstes die Außeneinflüsse des Licht-Dunkel-Wechsels und des Temperaturwechsels kombiniert (WANKA, 1962 b, bei Chlorella; WEGMANN und METZNER, 1971, bei Dunaliella). Die Zyklen setzten sich zusammen aus einer 6stündigen Dunkelzeit bei 28°C und einer 6stündigen Lichtzeit (12 000 Lux Warmtonlicht) bei 32°C. Die Verdünnung der Algensuspension erfolgte, wie auch bei den früher geschilderten Licht-Dunkel-Wechseln, am Ende jeder Dunkelzeit auf die RZZ 750; gegenüber dem LDW 6:$\overline{6}$ (vgl. S. 27) kam es zu einer deutlichen Verminderung der Teilungsschübe (sie lagen sogar geringfügig unter denen des 5:$\overline{2}$-Versuchs, vgl. S. 30, Abb. 12).

4. Untersuchungen im Rotlicht- bzw. Blaulicht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$

Um Zellmaterial mit verschiedenem Gehalt an Kohlenhydrat einzubeziehen, wurden die Algen kurzfristig in rotem oder blauem Licht (relative Erhöhung des Kohlenhydratgehalts bzw. relativ erhöhter Gehalt an Zellstickstoff, KOWALLIK, 1962; vgl. LAUDENBACH und PIRSON, 1969 und STEUP, 1972) - jeweils im Wechsel mit Dunkelheit (KOWALLIK, 1962; 1963) - gezogen; die Anzahl der gleichzeitig auftretenden Zoosporenmutterzellen im Farblicht ist mit denen im "Weißlicht" beim 5:$\overline{4}$-Licht-Dunkel-Wechsel (vgl. S. 29, Abb. 11) vergleichbar; gegenüber

dem "Weißlicht"-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$ (vgl. S. 27) kam es bei diesen Farblicht-Dunkel-Wechseln 6:$\overline{6}$ zu einer deutlichen Verringerung der Teilungsschübe. Auf die Hemmung der Zellvermehrung im Dunkeln hatten die Farblichtbehandlungen keinen Einfluß.

5. Untersuchungen im Starklicht-Schwachlicht-Wechsel

Synchronisierende Wirkungen von Starklicht-Schwachlicht-Wechseln (alternierend 6 Stunden 12 000 Lux und 6 Stunden 1 500 bzw. 1 000 Lux bei 32°C; Regulierung der Suspensionsdichte durch 12stündliche Verdünnung auf die RZZ 500 am Ende jeder Starklichtzeit) waren nicht feststellbar.

6. Untersuchungen im Licht-Dunkel-Wechsel bei Acetat-Ernährung

Bei diesen Versuchen diente (neben CO_2) 0,2% Acetat als externe Kohlenstoffquelle; die unter diesen Bedingungen durchgeführten LDW 6:$\overline{6}$, bei denen wegen des beschleunigten Wachstums die Kulturen am Ende jeder Dunkelzeit auf die relative Zellzahl 350 eingestellt wurden, zeichneten sich durch das Ausbleiben der sonst in der Lichtzeit typischen Anhäufung der Teilungsstadien (Zoosporenmutterzellen) aus (Abb. 14). Vielmehr wurde eine ziemlich

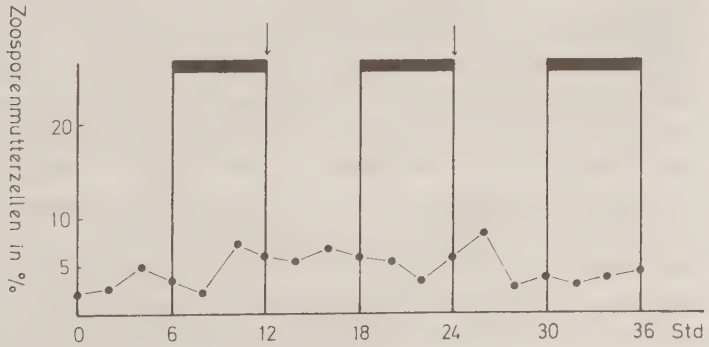


Abb. 14 Verteilung der Zoosporenmutterzellen im LDW 6:$\overline{6}$ mit 0,2% Acetat als zusätzliche Kohlenstoffquelle

(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

gleichmäßige Verteilung der Zoosporenmutterzellen in der Licht- und Dunkelzeit festgestellt; ihre Zahl schwankte zwischen 3 und 8%; bei diesen Versuchen traten Zellvermehrungen bzw. Teilungsstadien also auch im Dunkeln auf. Während Chlorella autotroph oder mixotroph wachsend mit Hilfe einer Licht-Dunkel-Behandlung synchronisierbar ist (SENGER, 1962; 1965; vgl. PIRSON, LORENZEN und RUPPEL, 1963), blieben die LDW-bedingten Teilungsschübe bei mixotroph kultivierten Zellen von Chlorogonium elongatum aus.

7. Versuche mit Vinblastinsulfat

ROBBINS und MARCUS (1964) sowie KIM und STAMBUK (1966) erzielten mit Vinblastinsulfat (=Vinblastin, Vincaleukoblastin, Velban), einem Hemmstoff der Metaphase (vgl. MITCHISON, 1971), der wieder auswaschbar, also reversibel entfernbar ist, an Säugetier- und insbesondere an HeLa-Zellen eine Synchronisation.
Eine zeitlich begrenzte Einwirkung von Vinblastin sollte jede Chlorogonium-Zelle bei Eintritt in das Metaphase-Stadium in ihrer Entwicklung hemmen; nach Entfernen der Hemmsubstanz, d.h. unter wieder normalisierten Entwicklungsbedingungen, müßten bei minimaler Streuung alle Zellen ein weitgehend homogenisiertes Startmaterial für Synchronkulturen im LDW darstellen. Erfolgt dieser Eingriff zu einem geeigneten Zeitpunkt, könnte man für einen Entwicklungsablauf der Zellen sogar vollsynchrones Material erhalten; allerdings müßte das Verfahren laufend wiederholt werden, da sonst in der Folge die Synchronisation im Zusammenhang mit der wieder auftretenden Streuung physiologischer Zustände verwischt wird.
Wie Versuche ergaben, blieb selbst die Erhöhung der von KIM und STAMBUK (1966) verwendeten Vinblastinkonzentration von 0,2 µg Vinblastin/ml ($=1{,}82 \cdot 10^{-7}$ M) um das 50 fache ohne Wirkung auf die Metaphase; bei 200 facher Steigerung kam es hingegen bereits zu sehr starken Schädigungen (Ab-

sterben), und ein Anstieg der Zellzahl erfolgte selbst kurze Zeit nach Vinblastin-Inkubation kaum noch. Der Hemmstoff wirkte demnach offensichtlich unspezifisch. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß für Chlorogonium der Spielraum zwischen spezifischer Wirkung und Schädigung durch Vinblastin so eng bemessen ist, daß die Anwendung für Synchronisierungszwecke nicht in Frage kommt.

B. Die Zusammensetzung autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen im Licht und im Dunkeln

Aus den Synchronisierungsversuchen bei autotroph ernährten Chlorogonium-Zellen hatte sich nur im Licht ein Zuwachs der Zellzahl ergeben; während er sich unter dem Einfluß des 6:$\overline{6}$-Licht-Dunkel-Wechsels im Alternieren hoher und niedriger Teilungsschübe äußerte (vgl. S. 24 und S. 31f.), erfolgte die Erhöhung der Zellzahl im bei Chlorella zur Vollsynchronisation führenden 14:$\overline{10}$-LDW in den Lichtzeiten weitgehend kontinuierlich (Abb. 15). In den Synchronanzuchten von Chlorella (vgl. LORENZEN, 1970) und Chlamydomonas (SCHLÖSSER, 1966; KATES und JONES, 1967) kommt es dagegen ausschließlich im Dunkeln zu einer Vermehrung der Zellzahl. Auf eine bei Chlorogonium am Anfang einer Dunkelzeit gelegentlich noch zu beobachtende, aber geringfügige Zunahme der Zellzahl und ihre Ursache wurde schon früher hingewiesen (vgl. S. 29).
Diese Teilungsunfähigkeit im Dunkeln könnte verantwortlich dafür sein, daß sich Chlorogonium im LDW nicht synchronisieren läßt.
Daher wird im folgenden versucht, den Ursachen dieser Teilungsunfähigkeit durch Untersuchungen des Licht- und des Dunkel-Stoffwechsels autotroph ernährter Chloro-

gonien an Hand des Gehaltes der Algen an Kohlenhydrat und Protein im Licht und im Dunkeln im 6:$\overline{6}$-Licht-Dunkel-Wechsel nachzugehen. Dieser LDW wurde deshalb gewählt,

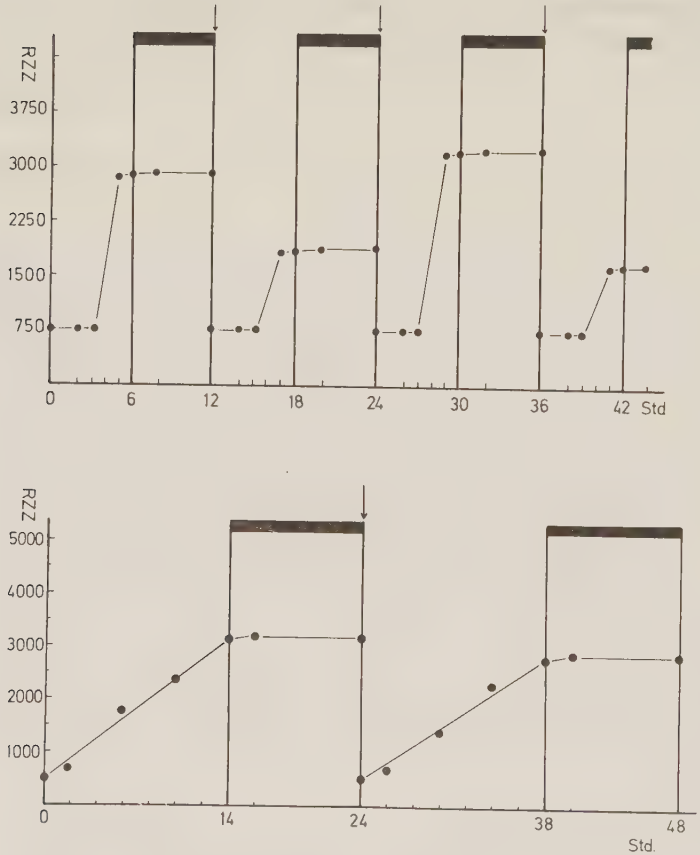


Abb. 15 Zoosporenfreisetzungen von Chlorogonium elongatum Stamm 16 in den Licht-Dunkel-Wechseln 6:$\overline{6}$ (oben) und 14:$\overline{10}$ (unten); vgl. auch Abb. 9 (S. 27).
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

weil er von allen Synchronisierungsversuchen die relativ besten Resultate erbracht hatte. Abb. 16 gibt die Ergebnisse dieser Bestimmungen wieder; dabei fiel besonders auf, daß die Kohlenhydratabnahme in der Dunkelzeit nicht - wie bei Chlorella (RUPPEL, 1962) - mit einer Zunahme des Proteins einherging. Die bei der Atmung freigesetzte Energie läßt sich nicht für die Proteinsynthese einsetzen. Detaillierte Analysen ergaben in 40% aller untersuchten Fälle einen geringfügigen Anstieg des Proteinspiegels in-

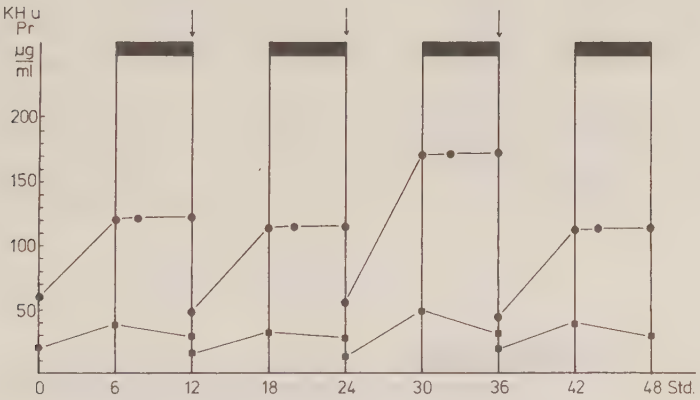


Abb. 16 Veränderungen im Proteingehalt+ (●——●) und Kohlenhydratgehalt (■——■) von Chlorogonium elongatum Stamm 16 im LDW 6:6̄
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

+ Der durchschnittliche prozentuale Anteil an TCA-löslichem Stickstoff wurde in Dunkel- und in Dauerlichtkulturen mit 4,5-6,5% bestimmt; bei der Berechnung des Proteins wurde daher vom Gesamt-N, multipliziert mit dem Faktor 6,25 (SPOEHR und MILNER, 1949) ausgegangen und der daraus resultierende systematische Fehler in Kauf genommen.

nerhalb der ersten 45 Minuten nach Überführung der Kulturen ins Dunkle. Der beobachtete Proteinanstieg (maximal 7%) erreichte dabei bereits 25 Minuten nach Verdunkelung 80% des Endwertes (Abb. 17).

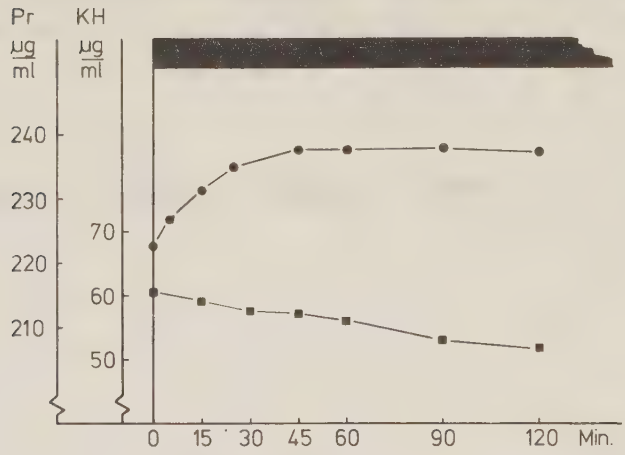


Abb. 17 Kurzfristig möglicher Proteinanstieg bei Chlorogonium elongatum nach Überführung ins Dunkle (autotrophe Anzucht)
●——● Protein ■——■ Kohlenhydrat

Die Abnahme des Kohlenhydratgehalts im Dunkeln (vgl. Abb. 18) läßt sich bei Chlorogonium in erster Linie auf Veratmung zurückführen. Der am Anfang einer Dunkelphase mitunter noch nachweisbare Proteinanstieg ist so minimal, daß er für den Kohlenhydratschwund nur von untergeordneter Bedeutung sein kann. Wieweit die Kohlenhydratreserven im Dunkeln noch für andere Zellbestandteile (z.B. Lipide) verwendet werden, bedarf einer genaueren Untersuchung.

C. Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen im Dunkeln

Aus den Versuchen im Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$ ergab sich bei Chlorogonium eine formale Korrelation zwischen Proteinsynthese und Zellteilung (vgl. Abb. 15 und 16): In den Lichtzeiten, in denen der Proteingehalt in den Kulturen stark zunahm, traten parallel dazu hohe Teilungsschübe auf, während in Lichtzeiten mit schwächerer Proteinzunahme in der Regel auch die Zahl der maximal in Teilung befindlichen Zellen niedriger war; in den Dunkelzeiten blieben dagegen der Proteingehalt und die Zellzahl unverändert. Der Anteil des pufferlöslichen Proteinstickstoffs am Gesamtstickstoff änderte sich im Dunkeln gegenüber Licht nicht wesentlich.
Kulturen, die nicht im LDW kultiviert wurden, sondern nach Dauerlicht ins Dunkle kamen, fehlte ein Zellzahl- und Proteinzuwachs gleichfalls (Abb. 18), so daß dabei

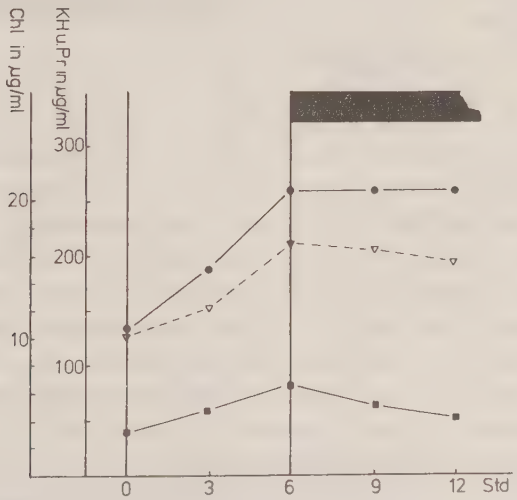


Abb. 18 Verlauf von Protein (●——●), Kohlenhydrat (■——■) und Chlorophyll (▽----▽) beim Übergang von Dauerlicht ins Dunkle

nicht Einflüsse des Licht-Dunkel-Wechsels beteiligt sein konnten. Der Chlorophyllgehalt sank im Dunkeln absolut um ungefähr 10%. Langfristige Untersuchungen des Dunkelstoffwechsels an Chlorogonium (> 24 Stunden) bestätigten eine dauerhafte Unterbindung des Anstiegs des Proteinspiegels und der Zellzahl.

Bezogen auf die Vermehrung des Proteins ergab sich unter autotrophen Ernährungsbedingungen zwischen Chlorogonium und Chlamydomonas prinzipiell Übereinstimmung: Im Dauerlicht kultivierte Zellen stellten bei Verdunkelung sofort ihren Proteinzuwachs ein (vgl. STEUP, 1972); ebenso unterblieb im (synchronisierenden) 12:$\overline{12}$-LDW bei Chlamydomonas während der Dunkelzeit der Anstieg des Proteingehalts (KATES und JONES, 1967).

Im Gegensatz zu Chlorogonium vermehrte sich Chlamydomonas bis zur 6. Stunde nach Verdunkelung nahezu in gleichem

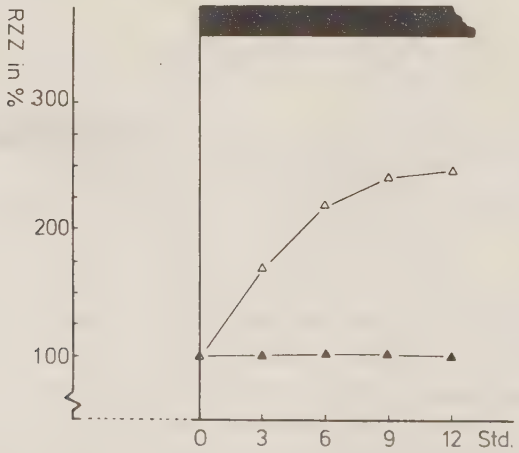


Abb. 19 Veränderung der Zellzahl von Chlorogonium elongatum (▲——▲) und Chlamydomonas reinhardii (△——△) nach Überführung ins Dunkle

Maße wie eine vergleichbare (nicht synchrone) Lichtkultur (vgl. Abb. 24, S.48); erst danach verringerte sich der Zuwachs der Zellzahl merklich und kam schließlich zwischen der 9. bis 12. Dunkelstunde zum Stillstand. Die relative Zellzahl stieg im Verlaufe dieser 9-12 Stunden bei Chlamydomonas noch um 150% gegenüber dem Ausgangswert (in Abb. 19 gleich 100% gesetzt), während bei Chlorogonium keine Zunahme im Dunkeln erfolgte.

Inwieweit demnach im Gegensatz zu Chlamydomonas bei Chlorogonium ein möglicher Zusammenhang zwischen lichtabhängiger Stickstoff- und Zellvermehrung besteht, sollten Versuche an Chlorogonium-Kulturen nach 12stündigem mäßigem Stickstoffmangel (der zu starker Anhäufung von Kohlenhydrat führt) zeigen.
Vor dem N-Entzug erfolgte die Anzucht der Kulturen unter Standardbedingungen im Dauerlicht. Nach vorsichtigem Abzentrifugieren bei 2 500 g für 2 Min. wurden die Zellen in der N-freien Nährlösung unter gleichzeitigem Einstellen einer konstanten Dichte (E_{1000} = 0,3-0,4) sofort resuspendiert und für 12 Stunden im Licht als Mangelkultur angezogen. Der N-Mangel wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge Ammonsalz aufgehoben (vgl. S. 5).
Nach Zufuhr von Stickstoff bei gleichzeitiger Verdunkelung ("Erholungsphase") stieg nun der N-Gehalt der Kultur (vgl. dagegen S. 39/40) kräftig an. Die N-Zunahme während der Dunkelerholung erfolgte bei Chlorogonium in einem Zeitraum von 9-12 Stunden, in dem sich der Stickstoffgehalt meist verdoppelte (Abb. 20); darüber hinaus wurde in keinem der Fälle ein weiterer N-Anstieg festgestellt. Das Verhältnis Kohlenhydrat : Protein änderte sich im Laufe der 12stündigen Dunkelerholung von 2,84 auf 0,25 (dem Durchschnittswert einer normalen Dauerlichtkultur unter optimalem Wachstum). Chlamydomonas-Zellen konnten ihren Proteingehalt unter vergleichbaren Bedingungen im Dunkeln ebenfalls deutlich erhöhen; eine prinzipielle Lichtabhängigkeit der Proteinvermehrung

besteht also bei beiden Organismen nicht.

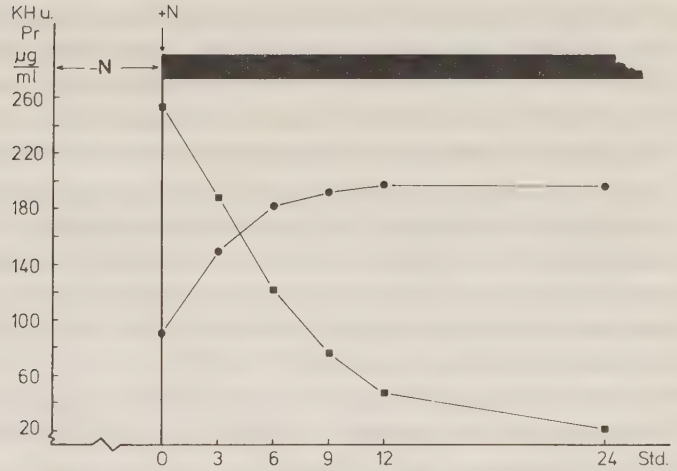


Abb. 20 Veränderungen des Proteingehalts (●——●) und des Kohlenhydratspiegels (■——■) in der Dunkelerholung (+N) nach 12stündigem Stickstoffentzug (-N)

Bei Chlorogonium unterblieb jedoch im Dunkeln trotz deutlicher Proteinvermehrung weiterhin eine Erhöhung der Zellzahl bzw. eine Zellteilung (auch bei Dunkelheit > 24 Stunden), während sich die Zellzahl bei Chlamydomonas in der 12stündigen "Dunkelerholung" um 85% steigerte (Abb. 21) gegenüber 150% bei Kulturen, die aus Dauerlicht ins Dunkle überführt wurden (vgl. Abb. 19).
Der DNA-Gehalt der Chlorogonium-Zellen nahm im Verlauf der "Dunkelerholung" ebenfalls nicht zu, sondern verringerte sich sogar geringfügig um 7-9% (weitere DNA-Untersuchungen S. 54 ff.).

Während des 12stündigen N-Entzugs im Licht erhöhte sich bei Chlorogonium die Zellzahl um ungefähr 90% (Abb. 22).

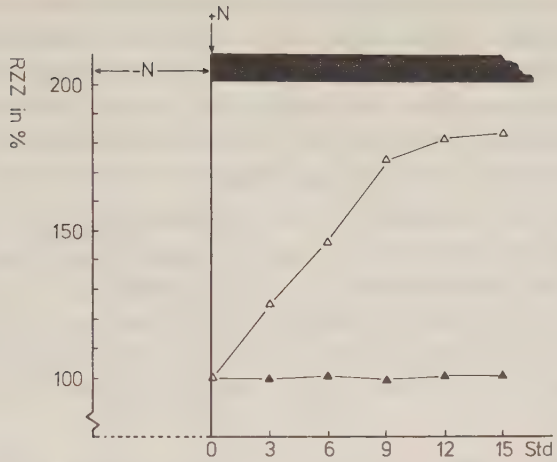


Abb. 21 Veränderung der Zellzahl von Chlorogonium (▲——▲) und Chlamydomonas (△——△) in der Dunkelerholung (+N) nach 12stündigem Stickstoffentzug (-N)

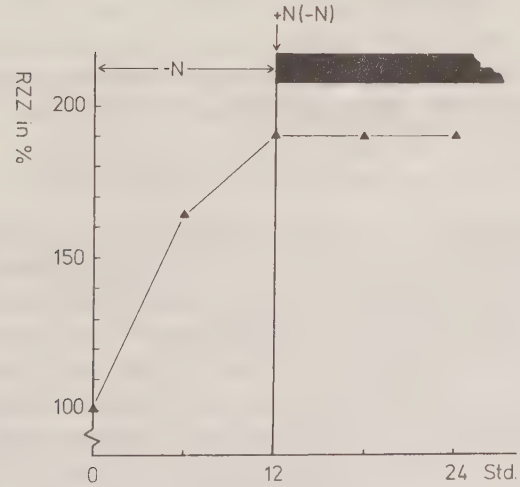


Abb. 22 Veränderung der Zellzahl von Chlorogonium bei Stickstoffentzug (-N) und anschließender Überführung ins Dunkle mit (+N) oder ohne (-N) Stickstoffzufuhr

Bei N-Mangel im Dunkeln (-N) sowie während der Erholungsphase im Dunkeln (+N) blieben die Zellzahlen gleichermaßen konstant (Abb. 22). Lichtausschluß bewirkte auch hier den Stillstand der Zellvermehrung, unabhängig davon, ob der Proteingehalt zunahm (Erholungsphase) oder nicht (N-Mangel im Dunkeln).

Wurde der N-Mangel bei Chlorogonium im Licht aufgehoben, konnte in zwei Stunden neben einem Proteinanstieg von 43% auch der Fortgang der Zellvermehrung beobachtet werden; bei anschließender Verlegung der Erholungsphase ins Dunkle wurde die Zellteilung sofort wieder unterbrochen, während der Proteinzuwachs weiterhin erfolgte.

Zu Zellvermehrungen kam es auch bei jenen Chlorogonium-Kulturen, deren "Lichterholung" nach 12stündigem N-Mangel mit DCMU + gehemmt wurde; die Zellzahl erhöhte sich hierbei innerhalb von 12 Stunden um reichlich ein Drittel (Abb. 23), während sie bei entsprechender "Dunkelerholung" konstant geblieben war (vgl. Abb. 21 und 22). Die Veränderungen des Protein- und Kohlenhydratgehalts glichen weitgehend denen bei Erholung im Dunkeln; allerdings war der Kohlenhydratschwund bei DCMU-Hemmung etwas größer (vgl. Abb. 20).
Im Dauerlicht autotroph normal angezogene Chlorogonium-

+ Der Hemmstoff DCMU wurde in 96%igem Methanol gelöst und lag in der Kulturflüssigkeit in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ M vor (WIESSNER, 1968); wie Kontrollversuche ergaben, wurde die photosynthetische Sauerstoffentwicklung in der vorliegenden Konzentration vollständig blockiert. Um Nebenwirkungen dieses Gifts sowie seines Lösungsmittels zu überprüfen bzw. gegebenenfalls auszuschließen, wurde DCMU auch stets den Dunkelkontrollen zugefügt, während Lichtkontrollen mit der entsprechenden Menge Methanol versetzt wurden.

Zellen, die anschließend im Dunkeln weiterkultiviert oder stattdessen im Licht mit DCMU gehemmt wurden, führten zu ähnlichen Resultaten.

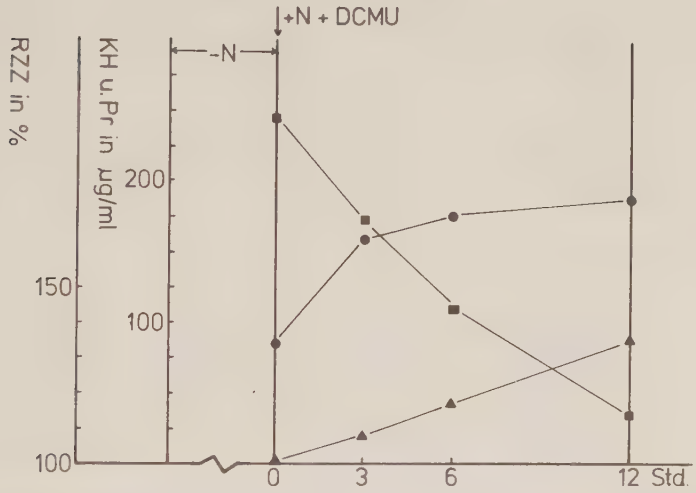


Abb. 23 Veränderungen der Zellzahl (▲——▲), des Gehalts an Protein (●——●) und Kohlenhydrat (■——■) von Chlorogonium in DCMU-gehemmter Lichterholung nach 12stündigem Stickstoffentzug (-N)

Bei DCMU-gehemmten Lichtkulturen von Chlorogonium ist der Zellzahlzuwachs gegenüber normalen Lichtkulturen zwar deutlich verringert, jedoch gut nachweisbar (Abb. 24, vgl. auch Abb. 23). Chlamydomonas-Kulturen zeigten bei DCMU-Hemmung etwa dieselben Zellvermehrungsraten wie im Dunkeln (vgl. Abb. 19, S. 42); eine Beeinträchtigung der Zellvermehrung durch DCMU, die auf eine - direkte oder indirekte - Lichtbeteiligung schließen läßt, ist nur bei Chlorogonium zu erkennen; die verringerte Zellvermehrung könnte darauf zurückzuführen sein, daß die cyclische Photophosphorylierung den für die Zellvermehrung erforder-

lichen Energiebedarf nur unzureichend decken kann. Bei Chlamydomonas scheint dagegen die hierfür benötigte Energie weitgehend von Atmungsvorgängen bereitgestellt zu werden.

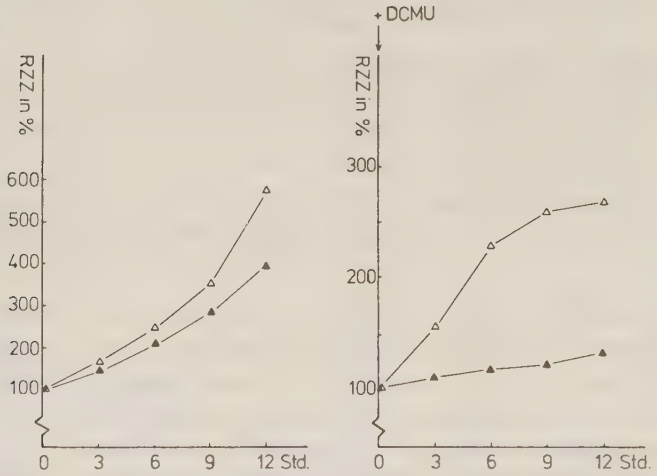


Abb. 24 Veränderung der Zellzahl von Chlorogonium (▲——▲) und Chlamydomonas (△——△) im Dauerlicht und bei DCMU-gehemmtem Wachstum

Alle Untersuchungen ergaben übereinstimmend, daß auch bei Chlorogonium elongatum ein direkter Zusammenhang zwischen Zellvermehrung und Proteinzuwachs nicht gegeben ist. Gleichzeitig bestätigte sich erneut der Lichtbedarf der Zellvermehrung, der bei Chlamydomonas unter vergleichbaren Ernährungsbedingungen nicht besteht. Protein kann bei Chlorogonium und Chlamydomonas prinzipiell auch ohne Licht vermehrt werden (vgl. S. 43).

Von Interesse ist die Beobachtung, daß in den jeweiligen Lichtzeiten besonders des 6:$\overline{6}$-Licht-Dunkel-Wechsels die Produktivität pro Lichtstunde (gemessen am Anstieg der Proteinwerte, des Kohlenhydratgehalts und der Zell-

zahlen) höher ist als in vergleichbaren Zeiträumen einer Dauerlichtkultur (vgl. Abb. 16, S. 39 mit Abb. 18, S. 41 und Abb. 15, S. 38 mit Abb. 24, S. 48), vgl.auch MEFFERT (1954). Obwohl Dunkelheit die Zellentwicklung bei Chlorogonium weitgehend stillegt (vgl. Abb. 15, S. 38), wird durch ihre Koordination mit Licht im LDW eine höhere synthetische Gesamtleistung der Zellen erreicht.

D. Der Einfluß von Belichtung und Verdunkelung auf die Kernteilung autotroph ernährter Zellen

Bisher wurde noch nicht entschieden, ob die Zellvermehrung auf eine Lichtabhängigkeit der Zellteilung oder der Kernteilung zurückzuführen ist (ohne Licht konnte dagegen u.U. die Freisetzung der Zoosporen erfolgen, vgl. S. 29). Zur Klärung dieser Frage wurden die Zellkerne nach GIEMSA angefärbt.

Je Probe wurden 3 x 12 ml Algensuspension für die Kernfärbung und 3 x 10 ml Algensuspension für die Bestimmung der Zoosporenmutterzellen und der RZZ verwendet.

Die Kernfärbung erfolgte in folgenden Schritten:

1 x Abzentrifugieren
1 x Waschen mit bidest. Wasser
1 x CARNOY-Fixiergemisch für 5 Min.
1 x CARNOY-Fixiergemisch für 15 Min.
(die Zellen müssen entfärbt sein!)
2 x Waschen mit 96%igem Äthanol p.a.
1 x Waschen mit 96%igem Äthanol p.a. : bidest.Wasser = 1:1
1 x Waschen mit bidest. Wasser
1 x Hydrolyse mit 1 n HCl für 15 Min. bei 60°C im Thermostat
1 x Waschen mit bidest. Wasser
1 x Phosphatpuffer pH 6,9 für 5 Min.
1 x GIEMSA-Farbstofflösung für 60-120 Min.
1 x Phosphatpuffer pH 6,9 für ca. 15 Min.

Das Ausgangsvolumen von 12 ml wurde dabei am Ende auf 4 ml eingeengt.
Zwischen jedem Arbeitsgang lag eine Zentrifugation (Tischzentrifuge CHRIST) von 2, nach der erfolgten Hydrolyse einmalig von 5 Min. Dauer. Bei den einzelnen Schritten war ein vorsichtiges Durchmischen der Proben erforderlich; nach Überführung der Algen in CARNOY-Fixiergemisch mußte während der Extraktion öfter geschüttelt werden.

Zusammensetzung des CARNOY-Fixiergemisches:

96%iges Äthanol p.a. : Eisessig = 3:1

Aufbereitung der GIEMSA-Farbstofflösung:

0,1 ml GIEMSA-Farbstofflösung + 1 ml steriles bidest. Wasser (maximale Haltbarkeit im Kühlschrank 5 Tage)

Die Auswertung erfolgte mit einem LEITZ-Lichtmikroskop, Okular PERIPLAN 12 x, Objektiv Apo 24:1, unter Verwendung eines Grünfilters.

In Abb. 25 sind gefärbte Kerne autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen wiedergegeben. Die Färbemethode bedingte meist eine leichte Deformation der Zellen, die aber die Auswertung der Versuche nicht beeinträchtigte.

Abb. 25 Angefärbte Kerne autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen

Vergrößerungen ca. 800-1000 fach

1, 2 einkernige Zellen
3 ältere einkernige Zelle
4 beginnende Kernteilung
5, 6 drei Kerne, einer in Teilung
7 vier Kerne
8, 9 vier Kerne, davon zwei in Teilung
10 fünf Kerne, davon einer in Teilung (oben rechts einkernige Jungzelle)
11 sechs Kerne
12 sieben bzw. acht Kerne

Ausgezählt wurden die angefärbten Kerne von jeweils 1000 Zellen in konstant festgelegten Abständen im Dunkeln. Eine Erhöhung der Kernzahl pro Zelle konnte dabei nicht festgestellt werden; die Gesamtkernzahl pro 1000 Zellen sowie die Kernindexzahl (Anzahl der Kerne pro Zelle) blieb im Dunkeln unverändert.
Parallel dazu durchgeführte Zellzählungen bestätigten die bisherigen Befunde, daß weder eine Vermehrung der Zoosporenmutterzellen noch eine Erhöhung der Gesamtzellzahl ohne Licht möglich ist. Diese lichtabhängige Zellvermehrung ist auf eine Lichtabhängigkeit der Kernteilung zurückzuführen.

Die Kernindexzahl schwankte im Licht (Dauerlichtkultur) zwischen 1,3-1,55; bei Verdunkelung der Kulturen wurde der bei Eintritt ins Dunkle jeweils vorliegende Wert unverändert beibehalten. Auch im Verlauf eines Licht-Dunkel-Wechsels blieb die Kernindexzahl während der Dunkelzeit konstant; im Licht erhöhte sich dagegen die

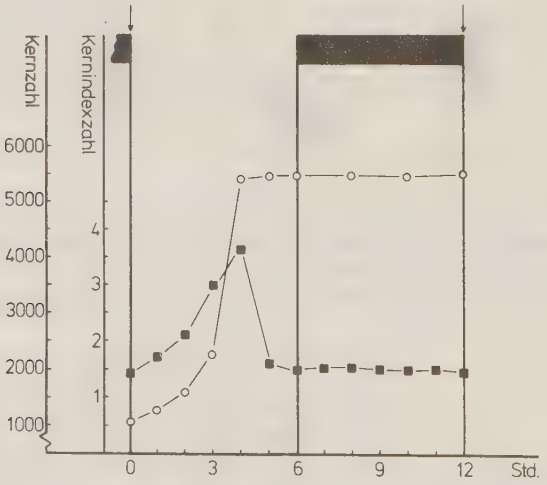


Abb. 26 Veränderung der Kernzahl (o——o) und Kernindexzahl (■——■) von Chlorogonium bei einem maximalen Teilungsschub im LDW 6:6 (vgl. S. 27 und S. 38)
(↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

Kernindexzahl bis auf 3,6 (bei maximalen Anhäufungen von Zoosporenmutterzellen um 60%, vgl. Abb. 26).

Versuche ergaben, daß die beschriebenen Effekte nicht durch Schwachlicht ausgelöst werden können, sondern von einer stärkeren Energielieferung durch Licht abhängig sind. Ein photomorphogenetisches System niederen Energiebedarfs ist daher wahrscheinlich nicht beteiligt.

Bei Beleuchtungsstärken von 50 ("Schwachlicht"), 200, 400, 500, 600 und 700 Lux (Warmtonlicht) ließ sich innerhalb von 16 Stunden in keinem Fall eine Kernteilung feststellen. Erst oberhalb von 700-800 Lux konnten Kernteilung und Zellzahlvermehrung, Protein-, Kohlenhydrat- und Chlorophyllanstieg sicher nachgewiesen werden (so stieg z.B. bei ca. 800 Lux der Stickstoffgehalt in 16 Stunden um 10-15%).

E. Untersuchungen des DNA-Gehalts im Licht und im Dunkeln bei autotropher Ernährung

Den bisherigen Ergebnissen zufolge lag es nahe, nun das Verhalten der Nucleinsäuren, insbesondere der DNA, im Licht und im Dunkeln zu verfolgen. Während der DNA-Anstieg im Dauerlicht innerhalb von 12 Stunden bei Chlorogonium rund 310% erreichte, wurden bei Chlamydomonas 470% gefunden; diese Werte stehen im ungefähren Einklang mit den entsprechenden Zellzahlen (vgl. Abb. 24, S. 48). Im Dunkeln erhöhte sich bei Chlamydomonas der DNA-Spiegel nach 6 Stunden um rund 140%, steigerte sich in weiteren 6 Dunkelstunden aber nur noch um 20% (vgl. Abb. 19, S. 42). Bei Chlorogonium ging das Stagnieren der Kernteilung im Dunkeln mit einem geringfügigen Absinken des DNA-Gehalts einher; innerhalb der ersten 6 Stunden ergab sich ein DNA-Schwund von 11%, der nach 12 Stunden bis zu 14% erreichte; darüberhinaus nahm der DNA-Gehalt kaum noch ab (Abb. 27).

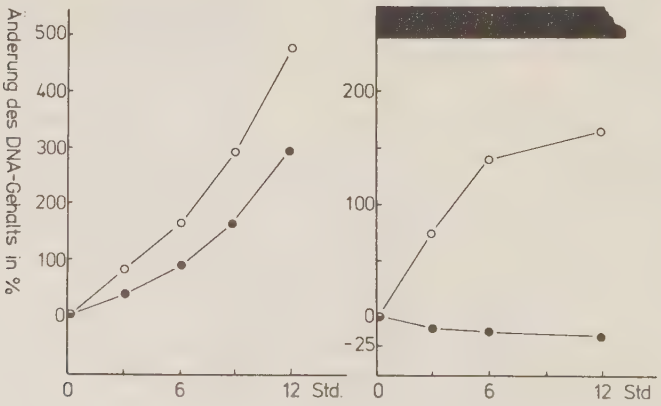


Abb. 27 Veränderung der DNA-Gehalte bei Chlorogonium (●——●) und Chlamydomonas (o——o) im Licht und im Dunkeln

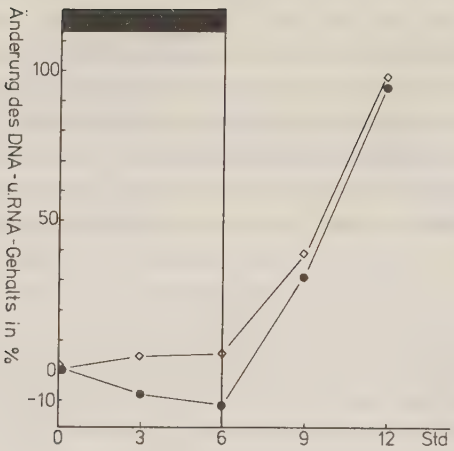
Ein Absinken des DNA-Gehalts autotroph ernährter Chlorogonien im Dunkeln unter Standardbedingungen (über den Verlauf der DNA in der "Dunkelerholung" nach vorangegangenem Stickstoffentzug wurde bereits auf S. 44 berichtet) ergaben sowohl Analysen, denen eine Bestimmung der Nucleinsäure aus einem Gesamtextrakt (WANKA, 1962 b) oder aus getrennten Extrakten (OGUR und ROSEN, 1950; vgl. RUPPEL, 1962) sowie nach Fällung der DNA aus homogenisierten Zellen (vgl. RICHTER und SENGER, 1964; vgl. RUPPEL und VAN WYK, 1965) zugrunde lagen.

Der geringe Schwund an DNA sollte auch an Hand ihres Thyminanteils charakterisiert werden; die Basen des getrockneten DNA-Präparates wurden mit Ameisensäure freigesetzt und das Hydrolysat nach entsprechender Behandlung (vgl. RUPPEL und VAN WYK, 1965) einer zweidimensionalen Papierchromatographie unterworfen (CRAMER, 1962; Lösungsmittelsysteme bei VERLY und PETITPAS-DEWANDRE, 1964). Die Auswertung erfolgte vor einer UV-Lampe mit speziellem Filter (vgl. PÁDR, 1958) nach Besprühen mit ammoniakalischer Fluoresceinlösung (CRAMER, 1962), wobei Verlöschungserscheinungen die Basen sichtbar machen (vgl. HAIS, 1958). Die Elution erfolgte mit HCl nach MARKHAM und SMITH (1951); photometriert wurde bei 265 nm gegen eine Blindprobe, wobei die Extinktion als relatives Maß verwendet wurde. Als Vergleichssubstanz wurde eine hochpolymere Handels-DNA gleichermaßen aufgearbeitet.

Da jedoch die Schwankungen von Aufarbeitung zu Aufarbeitung größer waren als die DNA-Verluste im Dunkeln, konnte aus diesen Experimenten kein genauerer Schluß auf die Höhe des DNA-Schwundes gezogen werden. Der Bestimmung der DNA (nach Fällung aus homogenisierten Zellen) durch UV-Absorption wurde daher der Vorzug gegeben.

Für 6 Stunden verdunkelte Chlorogonium-Kulturen glichen bereits nach ein bis eineinhalb Stunden Licht den DNA-Schwund aus; auch der RNA-Anstieg (bestimmt mit Orcin nach CERIOTTI, 1955) begann nach Belichtung sehr rasch (Abb. 28). Entsprechende Versuche mit Chlamydomonas bestätigten den deutlichen DNA-Anstieg auch im Dunkeln (vgl. Abb. 27); die RNA stieg dagegen im Mittel nur um 25%. Bei Übergang ins Licht kam es zu einer Förderung beider Synthesen, wobei die RNA bevorzugt war.

a



b

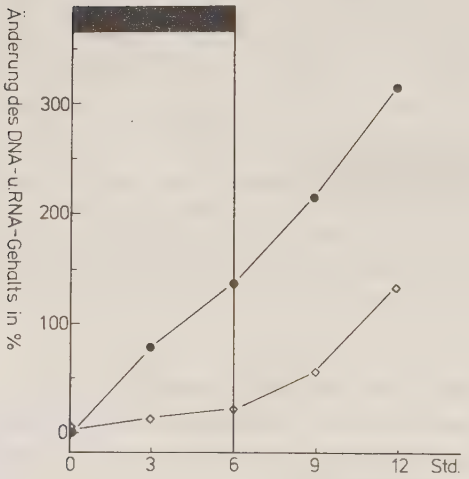


Abb. 28 **Veränderung der DNA- und RNA-Gehalte während 6stündiger Verdunkelung und anschließender Wiederbelichtung**

●—● DNA ◇—◇ RNA

a Chlorogonium

b Chlamydomonas

Wie sich der DNA-Schwund interpretieren läßt, ist noch unklar. Offenbar ist ein Anteil der DNA im Dunkeln instabil; um welchen Anteil es sich dabei handelt, bleibt vorerst unbekannt. Vielleicht kommt dafür amplifizierte rDNA in Frage (vgl. FICQ und BRACHET, 1971).

Die Lichtabhängigkeit der DNA-Synthese bei Chlorogonium zeigte sich besonders deutlich im Licht-Dunkel-Wechsel 6:6; auch hier wird die DNA im Dunkeln nicht vermehrt. Ihre Synthese setzt unmittelbar nach Belichtung ein und kann innerhalb von zwei bis drei Stunden eine Steigerung von 200-500% erfahren (Abb. 29). Zeitlich um ein bis zwei Stunden verschoben folgen dann die Kernteilungen nach (vgl. Abb. 26, S. 52). Bald darauf schließt sich die Freisetzung der Zoosporen an. Eine scharfe Grenze zwischen den einzelnen Vorgängen kann allerdings nicht gezogen werden, da bei den geschilderten Untersuchungen nie von

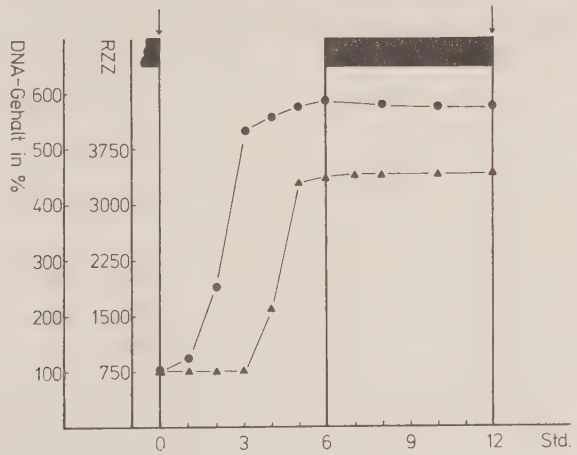


Abb. 29 Veränderung des DNA-Gehalts (●——●) und der Zellzahl (▲——▲) von Chlorogonium bei einem maximalen Teilungsschub im LDW 6:6 (↓ Zeitpunkt der Verdünnung)

vollsynchronen Kulturen ausgegangen werden konnte; die vorliegende Gruppensynchronisation verwischt durch das Vorhandensein jener Zellen, die keine Kernteilungen durchführen, die verschiedenen Abläufe.

Auf Grund der Befunde an autotroph ernährten Chlorogonien muß angenommen werden, daß die DNA-Synthesephase (S-Phase) lichtabhängig ist. Die G_2-Phase - in der die DNA konstant bleibt - sollte, zumindest in den 6:$\overline{6}$-Licht-Dunkel-Wechseln (vgl. Abb. 29 und Abb. 26, S. 52) sehr kurz sein; auch sie ist wohl ebenso lichtabhängig wie die eigentliche Kernteilung (Mitose), deren Lichtbedarf an Hand der Kernfärbungen (S. 50 f.) nachgewiesen wurde. Andernfalls müßten jene Zellen, die in ihrer Entwicklung die S-Phase passiert haben, bei Verdunkelung noch Teilungen durchführen.

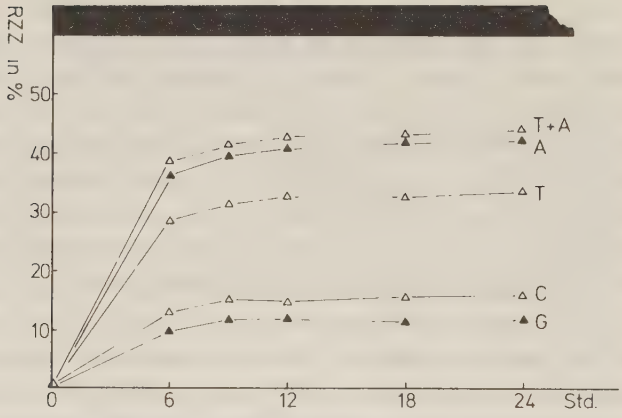
F. Wirkungen von Pyrimidin- und Purinderivaten auf die Kernteilung bei autotroph ernährten Chlorogonien im Dunkeln

Bei Chromatium vinosum berichteten SCHMIDT und KAMEN (1971) vom Einfluß zugesetzten ATPs auf die Zellteilung. Wie orientierende Versuche ergaben, war dies auch bei Chlorogonium der Fall. Die Zugabe von $2 \cdot 10^{-6}$M ATP löste nach Überführung ins Dunkle eine Erhöhung der Zellzahl von gut 20% in 24 Stunden aus. Dieser Befund legt die Annahme nahe, daß der Ausfall der cyclischen Photophosphorylierung im Dunkeln durch ATP wettgemacht wird, also ein rein energetischer Zusammenhang zwischen ATP-Effekt und Teilung besteht.

Da der Unterbindung der Kernteilung bzw. der DNA-Synthese im Dunkeln aber auch eine Störung der Synthesen der Pyrimidin- und Purinbasen zugrunde liegen könnte (CUMMINS und MITCHISON, 1967, wiesen auf einen Einfluß exogenen Adenins auf den Purinpool und auf die RNA-Synthese bei Schizosaccharomyces pombe hin), wurden daher auch die Wirkungen der Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin (jeweils $2 \cdot 10^{-6}$M) und der Adenin-Derivate Kinetin ($2 \cdot 10^{-6}$M) und Benzyladenin ($5 \cdot 10^{-6}$M) überprüft.

Die deutlichsten Effekte (Erhöhung der Zellzahl von 40-45% innerhalb von 24 Stunden) waren bei Applikation von Adenin und Kinetin zu beobachten (Abb. 30); die Steigerung der Zellzahl beschränkte sich in der Regel auf die ersten 9-12 Dunkelstunden nach Zugabe der Substanzen. Kombinierte Gaben von Adenin und Kinetin, Adenin und Thymin (letztere dargestellt in Abb. 30 a) u. a. im Verhältnis 1:1 ergaben im Vergleich zu den Einzelwirkungen kaum eine Steigerung der Dunkelteilungen (die Zugabe der entsprechenden Nucleoside Adenosin, Guanosin, Thymidin, Uridin und Cytidin rief bemerkenswerterweise nur unbedeutende Teilungen hervor).

a



b

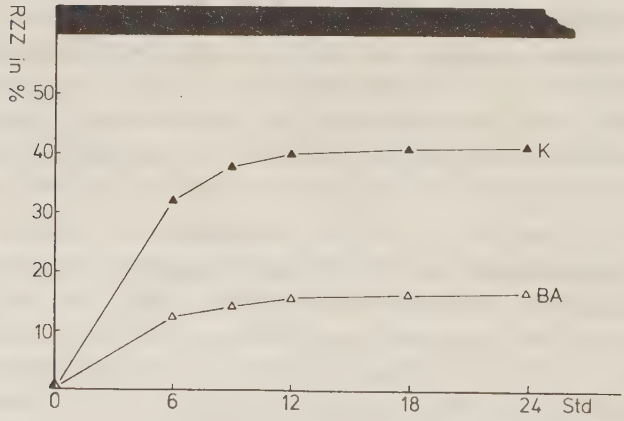


Abb. 30 **Dunkelteilungen bei Chlorogonium-Zellen, die bei Applikation von Adenin (A), Benzyladenin (BA), Cytosin (C), Guanin (G), Kinetin (K) und Thymin (T) beim Übergang von Dauerlicht ins Dunkle induziert werden können**

Im Vergleich zur Erhöhung der Zellzahl im Licht (Abb. 24, S. 48) ist der hier erreichte Zuwachs ohnehin gering; offenbar können Zellen, die sich beim Übergang von Licht in Dunkelheit gerade in einer Entwicklungsphase befinden, in der die DNA-Synthese (S-Phase) im Vordergrund steht, unter diesen Bedingungen noch Kernteilungen ausführen (vgl. auch S. 65).
Daß Adenin bzw. dessen Derivate im Dunkeln als Kohlenstoffquelle dienen, ist auszuschließen; Kontrollinkubationen mit den C-Körpern der jeweiligen Substanz entsprechenden Mengen Na-Acetat verursachten im Dunkeln keine Teilungen.

Die Zugabe von Asparaginsäure im Dunkeln ergab keine Anhaltspunkte dafür, daß die Synthese dieser Aminosäure (eines gemeinsamen Substrats für die Aufbauwege der Pyrimidine und Purine) und damit der Aufbau der Nucleinsäurebasen gestört ist.

Synchronisierende Wirkungen des Adenins bzw. verwandter Substanzen waren nicht festzustellen. Auf die Applikation von cAMP (JOST und RICKENBERG, 1971; vgl. auch PASTAN und PERLMAN, 1971) reagierten die Zellen nicht mit einer Dunkelteilung. Inwieweit exogenes cAMP bei grünen Einzellern überhaupt wirkt und inwieweit es von den Zellen aufgenommen werden kann, ist wohl bisher weitgehend offen.

Bei Übergang von Dunkel in Licht hatten mit Adenin inkubierte Kulturen den gleichen Zellzuwachs wie die entsprechenden Kontrollen (Abb. 31 a). Bei ablaufender Photosynthese ist der Einfluß des Adenins auf die Teilungsvorgänge vermutlich nicht nachweisbar, da ein zusätzlicher Bedarf an exogenen Substanzen für bestimmte Synthesen (z.B. der Pyrimidine und Purine) dann nicht besteht. Wurden dieselben Kulturen bei Belichtung mit DCMU gehemmt und dabei gleichzeitig mit Adenin inkubiert, war die Zellzahl in 6 Stunden gegenüber den Kontrollversuchen ohne Basenzusatz ungefähr verdoppelt (Abb. 31 b). In diesem Fall, wo die offenkettige Photophosphorylierung gehemmt

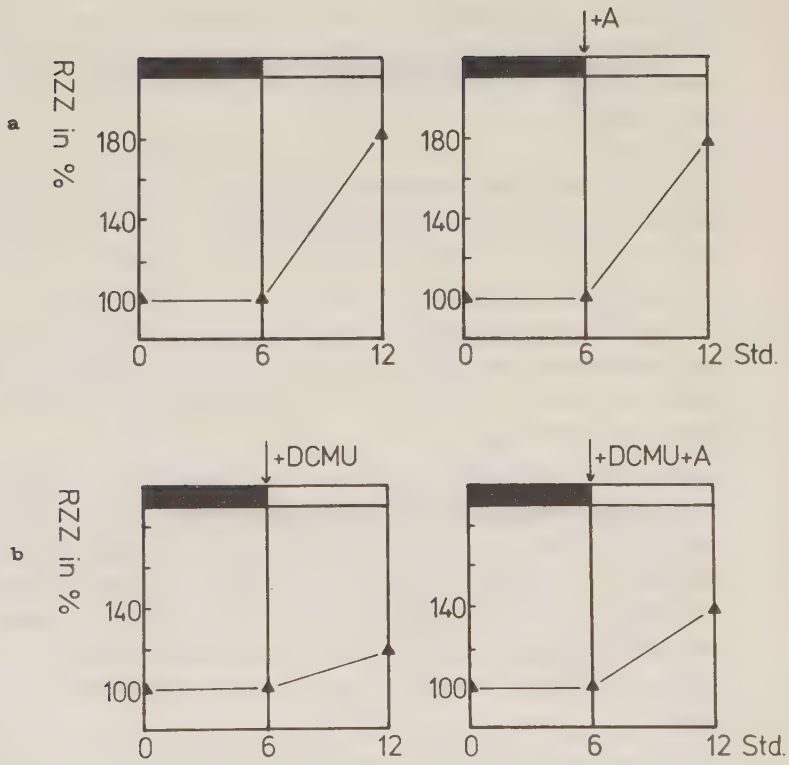


Abb. 31 **Einfluß von Adenin (+A) auf die Zellteilungen bei Übergang in Licht unter normalen Bedingungen (a) und bei Hemmung mit DCMU (b); links sind die jeweiligen Kontrollversuche dargestellt.**

Die Voranzucht der Chlorogonium-Zellen erfolgte autotroph im Dauerlicht.

ist, könnten die Wirkungen des ATPs aus der cyclischen Photophosphorylierung auf den Zellzuwachs (vgl. S. 47) und der Einfluß des Adenins, der im Dunkeln zu beobachten war, addiert sein.

Mit der unter Lichtausschluß bei gleichzeitiger Zugabe von Adenin erfolgenden Kernteilung und der Erhöhung der Zellzahl ging auch eine DNA-Vermehrung einher (Abb. 32). Während die UV-Absorptionsmessungen (nach Fällung der DNA, vgl. S. 55) bei den Kontrollanzuchten wieder innerhalb der ersten 6 Stunden einen DNA-Schwund von rund 11% (vgl. S. 54) ergaben, der nach 18 Stunden Dunkelheit insgesamt 14% ausmachte, führten die colorimetrischen Bestimmungen zu stärkeren DNA-Abnahmen; sie betrugen nach 18 Stunden 29%. Dies zwingt zu der Annahme, daß die durch Colorimetrie erhaltenen Meßpunkte zu niedrig lagen, da hier der durch Dunkelatmung bedingte Kohlenhydratschwund zumindest teilweise mit in den höheren DNA-

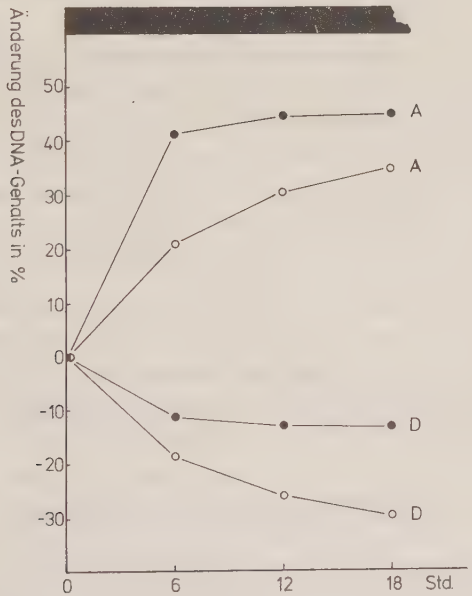


Abb. 32 Veränderungen der DNA-Gehalte bei Überführung ins Dunkle unter gleichzeitiger Adenin-Applikation (A) und bei Kontrollanzuchten (D)

●——● UV-Absorptionsmessung
o——o Colorimetrische Bestimmung

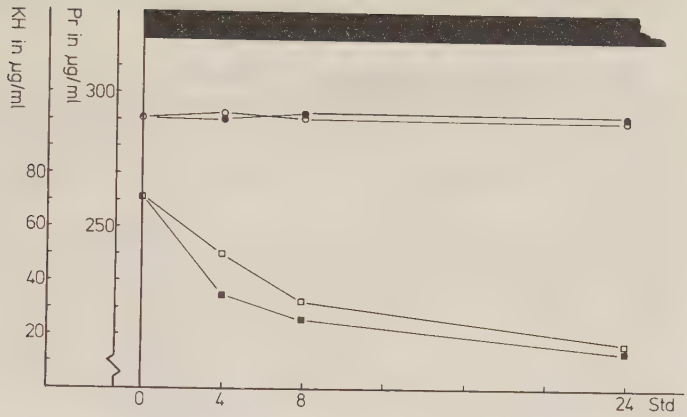
Verlust eingeht. Umgekehrt ergaben die colorimetrischen Messungen für die Adenin-Kulturen einen geringeren Anstieg, da sich hier der erhöhte Kohlenhydratschwund, auf den anschließend noch kurz eingegangen wird (vgl. Abb. 33), auf die tatsächliche DNA-Vermehrung vermindernd auswirkte. Die UV-Messungen charakterisierten dagegen den DNA-Verlauf adenininkubierter Kulturen (ca. 40%iger DNA-Anstieg in 9-12 Stunden)in Übereinstimmung mit den übrigen Befunden recht treffend (vgl. S. 60). Daß Desoxypentosen (andere als Desoxyribose) den DNA-Wert verfälschen können, hat schon RUPPEL (1962) berichtet.

Bei Untersuchungen des Dunkelstoffwechsels adeninbehandelter Chlorogonien wurde gegenüber den Kontrollen ein um gut ein Drittel erhöhter Kohlenhydratabbau gefunden, während der Proteingehalt unverändert, d.h. konstant, blieb; auch war ein erhöhter Sauerstoffverbrauch (verstärkte Dunkelatmung) der Adenin-Kulturen meßbar, der sein Optimum nach zweieinhalb bis drei Stunden erreichte und nach 6-7 Stunden die gleichen Raten aufwies wie eine normale Dunkelkultur (Kontrolle). Mit Thymin ergab sich ähnliches, jedoch in abgeschwächter Form (Abb. 33).

Die erhöhte Atmung, die sich durch polarographische Sauerstoffmessungen nachweisen ließ, könnte (Atmungs-) Energie für Teilungen und DNA-Synthese bereitstellen, die im Prinzip bei Zellen eines bestimmten Entwicklungszustandes (vgl. S. 61) ohne Adenin-Zusatz zwar noch möglich wären, denen aber die hierzu erforderliche (Licht-) Energie im Augenblick der Verdunkelung fehlt.

Bei Chlamydomonas reinhardii war ein Unterschied zwischen adeninbehandelten Zellen und normalen Kulturen im Licht und im Dunkeln nicht nachweisbar.

a



b

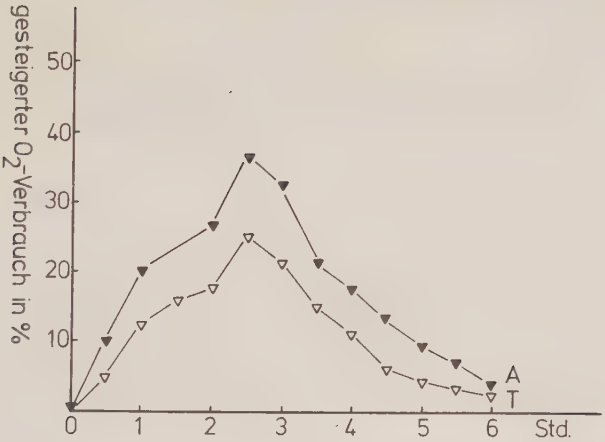


Abb. 33 a Wirkungen von Adenin auf den Gehalt an Protein und Kohlenhydrat im Dunkeln bei autotroph angezogenen Chlorogonien

Protein: ●——● Adenin-Kultur, o——o Kontrolle
Kohlenhydrat: ■——■ Adenin-Kultur, □——□ Kontrolle

b Gegenüber normalen Dunkelkulturen gesteigerte Atmung nach Applikation von Adenin (A) und Thymin (T) bei autotroph angezogenen Chlorogonien

G. Der Einfluß von Acetat auf das Wachstum im Dunkeln

Der hemmende Einfluß der Dunkelheit auf die DNA-Synthese und die Kernteilung autotroph ernährter Chlorogonien konnte langfristig durch Anzucht im acetathaltigen Nährmedium (vgl. STABENAU, 1971) aufgehoben werden.
Photoautotroph kultivierte Algen, die bei Verdunkelung unter Zugabe von 0,2% Acetat weiterkultiviert wurden, zeigten nach 2-3stündiger Adaptation an das heterotrophe Acetatstoffwechselsystem lichtunabhängig deutliches Wachstum (DNA-Synthese, Kern- und Zellteilung, Kohlenhydratproduktion und Proteinzuwachs).

Daß auch unter heterotrophen Ernährungsbedingungen Zellvermehrung und Proteinanstieg nicht unmittelbar korrelieren (vgl. S. 41 ff.), ging aus Versuchen hervor, in denen photoautotroph ernährte Chlorogonium-Zellen nach 4stündigem Stickstoffentzug im Dunkeln mit Acetat versorgt waren. Nach erfolgter Acetat-Adaptation erhöhte sich die Zellzahl, während der Proteingehalt konstant blieb.

Ein grundlegend anderes Verhalten der Organismen bei Acetat-($+CO_2$)Ernährung hatte sich auch schon in den entsprechenden Licht-Dunkel-Wechseln (Abb. 14, S. 35) angedeutet, wo Anhäufungen von Zoosporenmutterzellen (Teilungsstadien), d.h. Teilungsschübe, im Licht ausblieben und die Zellzahlen im Licht und im Dunkeln (also unabhängig vom LDW) gleichmäßig anstiegen.

Auch an Dauerlichtkulturen, die mit Acetat ($+CO_2$) ernährt waren (Mixotrophie), wurde nach Verdunkelung (Heterotrophie) keine signifikante Beeinflussung des Verlaufs von Kohlenhydrat, Protein, DNA und Zellzahl (Abb. 34) festgestellt. Der Chlorophyllgehalt stieg aber in 6 Stunden Licht absolut um 45% und bei anschließender Verdunkelung in 6 Stunden um 18%. Ähnlich veränderte sich der absolute Chlorophyllgehalt im 6:6-Licht-Dunkel-Wechsel (Abb. 14).

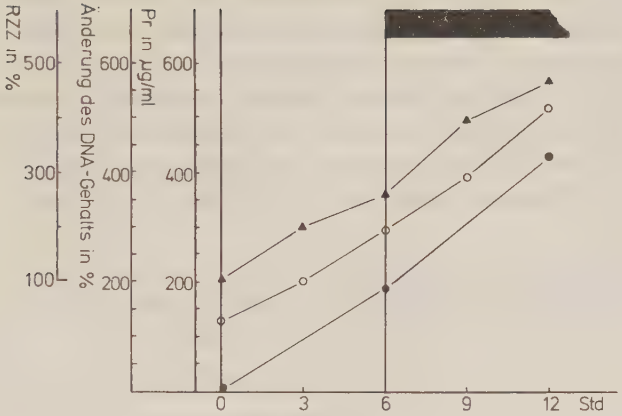


Abb. 34 Wachstum von Chlorogonium in acetathaltigem Nährmedium (+CO_2) bei Übergang von Dauerlicht ins Dunkle

o——o Protein, ●——● DNA, ▲——▲ Zellzahl

Die Wirkungen der Verdunkelung bzw. des Licht-Dunkel-Wechsels auf autotroph wachsende Zellen werden durch Acetaternährung vollkommen aufgehoben; dem Ablauf dieser markanten Umstellung vom auto- auf den heterotrophen Stoffwechseltypus muß im einzelnen noch nachgegangen werden (vgl. auch S. 70, 73).

H. Untersuchungen von Enzymaktivitäten

In den bisherigen Ergebnissen war an mineralisch ernährten Chlorogonium-Zellen eine auffällig starke Lichtabhängigkeit der Zellentwicklung nachgewiesen worden. An einigen wichtigen Enzymen des Kohlenhydratabbaus soll untersucht werden, inwieweit sich der Einfluß von Licht und Dunkelheit auf Enzymaktivitäten autotroph und mit Acetat ($+CO_2$) kultivierter Algen auswirkt.

1. Vergleich von Enzymaktivitäten bei photoautotropher, mixotropher und heterotropher Anzucht

Eines der regulierbaren mitochondrialen Enzyme und bedeutungsvoll für die Gesamtumsatzrate des Zitronensäure-Zyklus ist die Isocitratdehydrogenase. Die spezifischen Aktivitäten der ICDH in Massenkulturen von Chlorogonium wurden mit beiden Wasserstoffakzeptoren, also mit NAD^+ und $NADP^+$, bestimmt. Daß es sich bei der NAD^+- und $NADP^+$-abhängigen Isocitratdehydrogenase um ein und dasselbe Enzymprotein handeln muß, ging aus gelelektrophoretischen Bestimmungen der jeweiligen Enzymbanden (Elektropherogramm) hervor. Ihre R_f-Werte stimmten völlig überein (auch eine unterschiedliche Kompartimentierung des NAD^+- bzw. $NADP^+$-umsetzenden Enzyms dürfte danach nicht gegeben sein; vgl. FISCHER, 1969):

R_f-Wert der NAD^+-ICDH: $\frac{14.1}{21.2} = 0.665$

(vgl. Abb.35)

R_f-Wert der $NADP^+$-ICDH: $\frac{16.2}{24.4} = 0.665$

Die im Extrakt vorliegende Aktivität des NAD^+-Enzyms war allerdings im Vergleich zu der des $NADP^+$-abhängigen Enzyms außerordentlich niedrig. Wesentlich für den Tricarbonsäure-Zyklus dürfte beim vorliegenden Chloro-

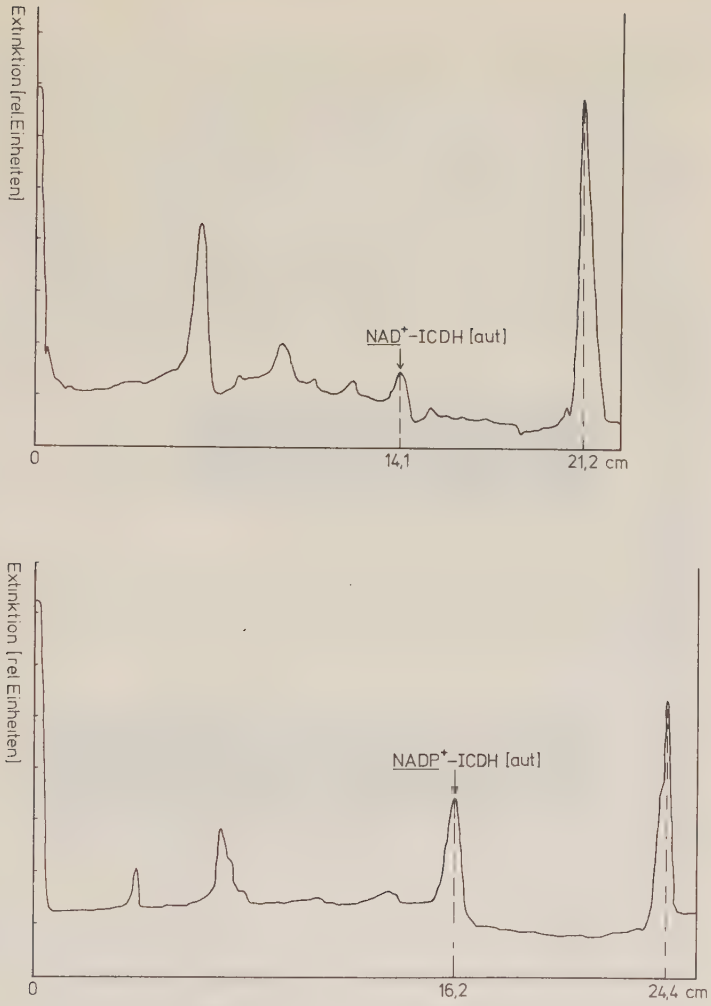


Abb. 35 Photometrisch ausgewertete Elektropherogramme zur Charakterisierung der Enzymbanden der NAD^+- und $NADP^+$-abhängigen ICDH bei photoautotropher (aut) Ernährung von Chlorogonium elongatum Stamm 16

gonium-Stamm das $NADP^+$-abhängige Enzym sein, dessen spezifische Aktivitäten bei photoautotrophen, mixotrophen (Dauerlicht) und heterotrophen (Dauerdunkel) Ernährungsbedingungen Abb. 36 zu entnehmen sind (zum Vergleich sind auch die bedeutend geringeren Aktivitäten der NAD^+-ICDH dargestellt). Ein deutlicher Unterschied in den jeweiligen Aktivitäten wurde festgestellt in der Reihenfolge autotroph (100%) - mixotroph (230%) - heterotroph (330%)[+]. Auf die Mitochondrientätigkeit übertragen ergäbe sich hieraus die Aussage, daß unter heterotrophen Bedingungen die höchste, unter photoautotrophen Bedingungen die niedrigste Mitochondrienaktivität vorliegt. Das Verhalten der ICDH unter autotrophen Bedingungen wird im nächsten Abschnitt (2.) noch eingehender untersucht.

Zuvor soll aber noch kurz auf ein anderes Enzym eingegangen werden, dem beim Glucoseabbau auf dem Wege des Pentosephosphat-Zyklus eine Schlüsselstellung zukommt: Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die zu den konstitutiven Enzymen gerechnete G6PDH reagierte auf die verschiedenen Ernährungsbedingungen ähnlich wie die ICDH, doch waren die Aktivitätsunterschiede nicht so signifikant (Abb. 37) wie beim mitochondrialen Enzym. Analog dazu verhielt sich die 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase.

Daneben wurde auch die 5-Dehydroxyshikimisäure-Reduktase untersucht, die sich in dem von FEIERABEND (1965) beschriebenen Enzymsystem wegen ihres indifferenten Verhaltens als geeignetes Vergleichsenzym erwiesen hatte. Bei diesem für den Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren wesentlichen Enzym lag die Aktivität dagegen nach photoautotropher Anzucht am höchsten, während die Aktivitäten nach mixo- und heterotropher etwas geringer -

---

[+] Zwischen den prozentualen Aktivitätsunterschieden der $NADP^+$- und der NAD^+-ICDH ergab sich eindeutige Übereinstimmung, die nochmals bekräftigt, daß in beiden Fällen dasselbe Enzymprotein vorliegen dürfte.

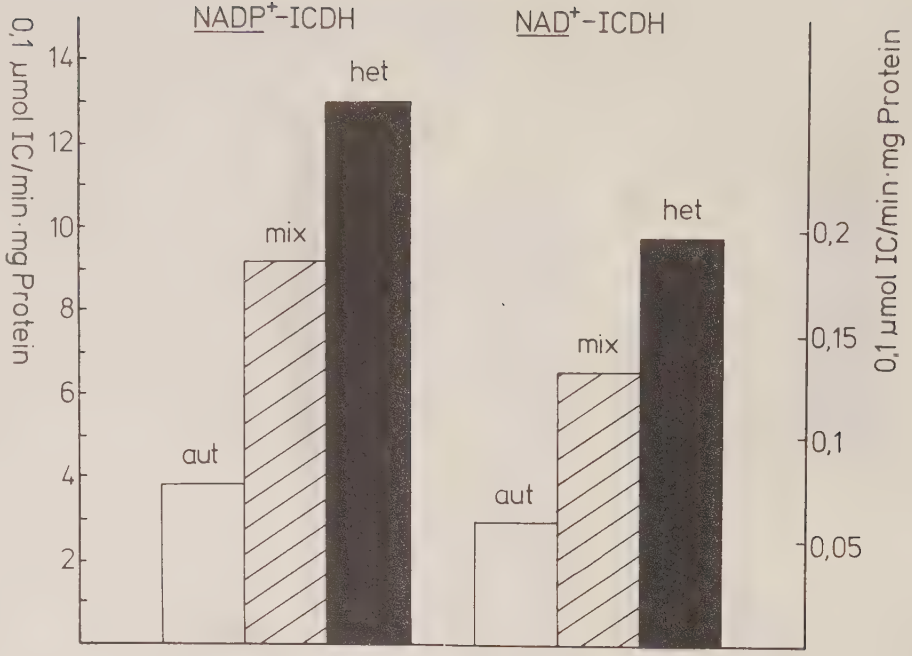


Abb. 36 Spezifische Aktivitäten der $NADP^+$- und der NAD^+-abhängigen ICDH bei Chlorogonium elongatum St.16 unter verschiedenen Ernährungsbedingungen

aut = photoautotroph, mix = mixotroph, het = heterotroph

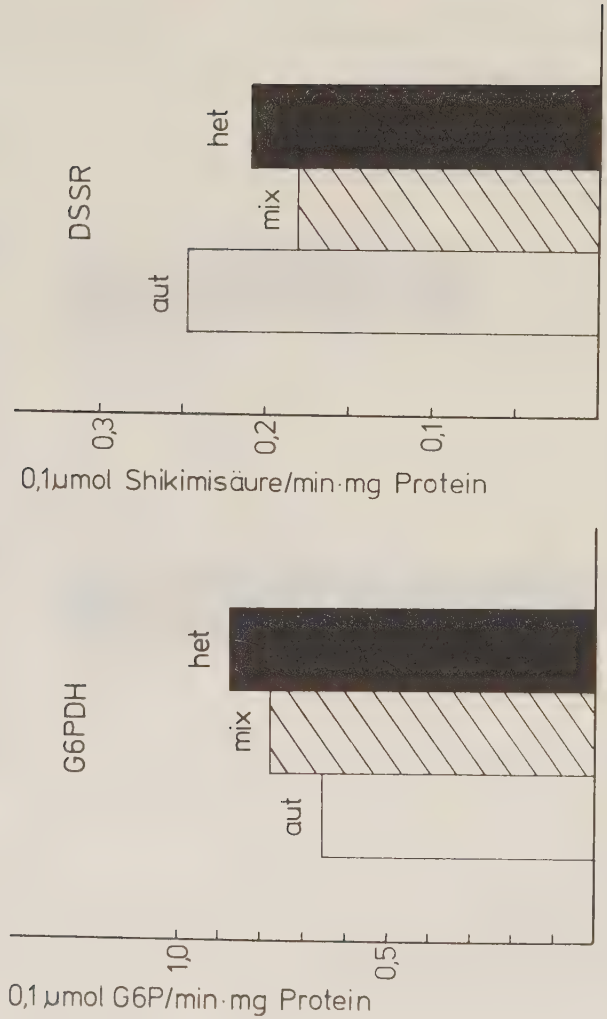


Abb. 37 Spezifische Aktivitäten der G6PDH und der DSSR bei Chlorogonium elongatum St.16 unter verschiedenen Ernährungsbedingungen

aut = photoautotroph, mix = mixotroph, het = heterotroph

und untereinander nahezu gleich - waren (Abb. 37). Lohnend schien daher vor allem eine Untersuchung der Aktivitäten der Enzyme des Kohlenhydratabbaus - besonders der ICDH - im Licht und im Dunkeln zu sein, um weitere Hinweise für die markante Lichtabhängigkeit des Wachstums autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen zu erhalten.

2. Enzymaktivitäten der ICDH und G6PDH autotroph ernährter Zellen im Licht und im Dunkeln

Von besonderem Interesse war es festzustellen, ob Aktivitätsunterschiede der mitochondrialen ICDH auch zwischen autotropher Anzucht im Licht und bei Dunkelheit bestehen.
Die Bestimmungen ergaben im Dunkeln gegenüber Licht ein deutliches Absinken der Isocitrat-Dehydrogenase um über die Hälfte (Abb. 38 a); die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase änderte sich dagegen im Licht und Dunkeln nicht merklich.

Unter gleichen Versuchsbedingungen erfolgte bei der aus Chlamydomonas reinhardii extrahierten ICDH im Gegensatz zum Licht im Dunkeln sogar ein kurzfristiger Anstieg der Aktivität (wahrscheinlich der Ausdruck für das Einsetzen des Dunkelanabolismus), Abb. 38 b.

Noch deutlicher kam der Einfluß der Dunkelheit auf die ICDH-Aktivität autotropher Chlorogonien im 6:$\overline{6}$-Licht-Dunkel-Wechsel zum Ausdruck (Abb. 39 a). Bei Wiederbelichtung stieg die Aktivität stets rasch an.
Zur Kontrolle wurden Chlorogonium-Kulturen aus LDW- in Dauerlicht-Bedingungen überführt (Abb. 39 b), in denen sich die Enzymaktivität bald auf einen festen Wert einstellte.

Die Aktivität der G6PDH blieb vom Licht-Dunkel-Wechsel weitgehend unbeeinflußt.

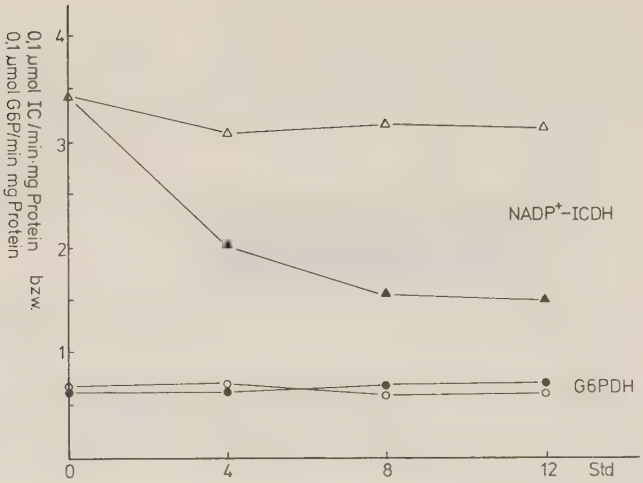


Abb. 38 a Spezifische Aktivitäten der ICDH und der G6PDH im Licht (o , △) und nach erfolgter Verdunkelung (● , ▲) bei Chlorogonium elongatum St.16 unter autotrophen Bedingungen

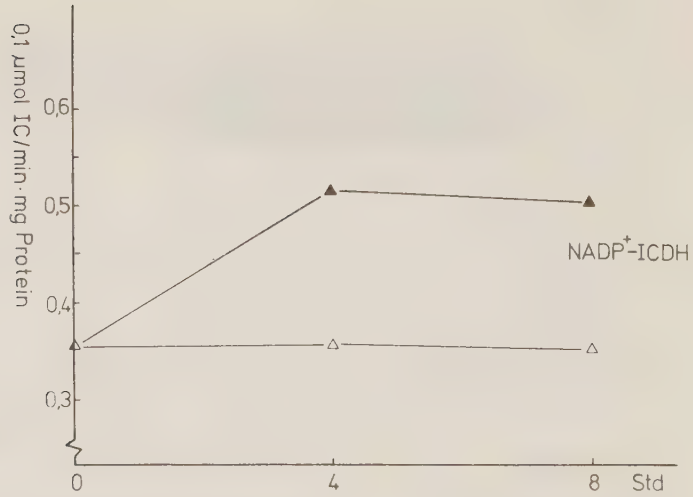


Abb. 38 b Spezifische Aktivität der ICDH im Licht (△) und nach erfolgter Verdunkelung (▲) bei Chlamydomonas reinhardii unter autotrophen Bedingungen

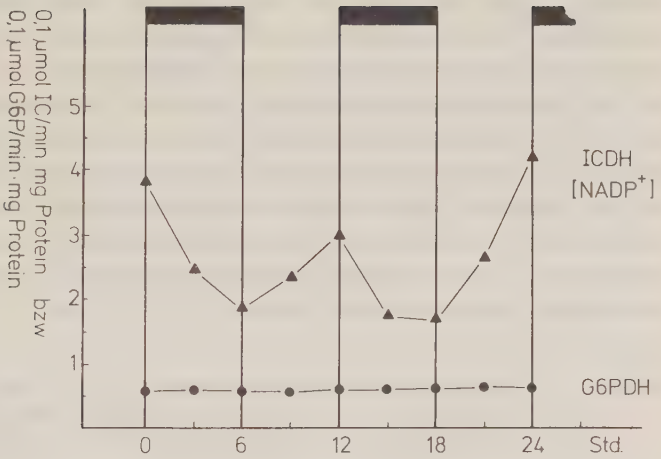


Abb. 39 a Spezifische Aktivitäten der ICDH und der G6PDH bei Chlorogonium elongatum St.16 im LDW 6:6 unter autotrophen Bedingungen

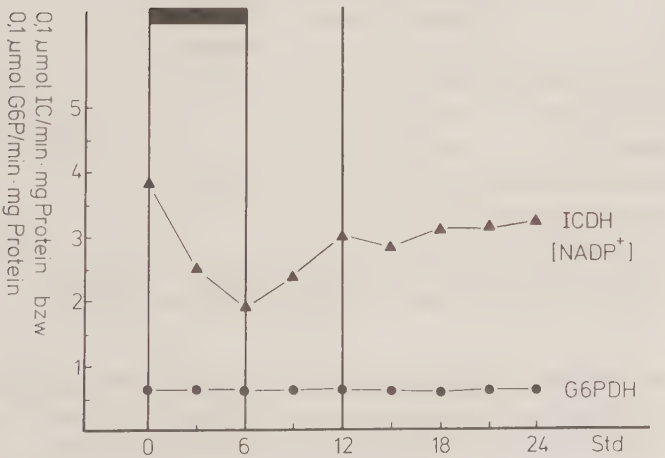


Abb. 39 b Spezifische Aktivitäten der ICDH und der G6PDH bei Chlorogonium elongatum St.16 beim Übergang von LDW- in Dauerlicht-Bedingungen

Um zu zeigen, daß es sich bei den Aktivitätsmessungen um echte Änderungen handelte und nicht um Wirkungen hemmender oder aktivierender Substanzen, die zu verschiedenen Zeiten im Rohextrakt in unterschiedlicher Menge enthalten sein können (vgl. BERGER, 1964), wurden zu gleicher Zeit gewonnene Extrakte von Licht- und Dunkel-Kulturen gemischt und anschließend die Aktivitäten gemessen (Tabelle 1); wenn keinerlei Inhibitoren oder Aktivatoren in einem der Extrakte enthalten sind, müssen die Messungen an den Mischungen Mittelwerte der Messungen an den Extrakten selbst ergeben (vgl. MUKERJI et al., 1961).

Tabelle 1 : Aktivitäten der ICDH (ΔE/10 Min.) nach Mischung der zu gleicher Zeit gewonnenen Rohextrakte aus autotrophen Licht- und Dunkel-Kulturen

	Aktivität				
	nach 8 Stunden		Mischung Licht + Dunkel	theoret. Mittel	Abweichung vom Mittel in %
	Licht	Dunkel			
Chlorogonium	173	93	150	133	+ 13
Chlamydomonas	101	132	126	117	+ 8

Bei den Tests wurden jeweils 0,01 ml Chlorogonium- bzw. 0,1 ml Chlamydomonas-Rohextrakt verwendet.

Die Messungen ergaben gegenüber den theoretisch zu erwartenden (d.h. errechneten) Enzymaktivitäten Abweichungen von 8-13%, die kaum signifikant sind; hiernach wurden also die bestehenden Unterschiede in der Enzymaktivität der ICDH im Licht und im Dunkeln sowie im LDW nicht durch Hemmstoffe hervorgerufen.

Besonders auffällig ist der Aktivitätsrückgang der ICDH autotroph ernährter Chlorogonien im Dunkeln, der gleichzeitig mit dem Ausbleiben der Kernteilung (S. 52) bzw. dem Stillstand der DNA-Synthese (S. 54; 57) zu beobachten war. Inwieweit hier die Aktivität der als allosterisches Enzym bekannten ICDH (CHEN und PLAUT, 1963; HATHAWAY und ATKINSON, 1963) durch ATP reguliert werden kann (vgl. PREISS und KOSUGE, 1970), sollten entsprechende Versuche zeigen; gleichzeitig wurden die Wirkungen von ADP und AMP (vgl. FISCHER, 1969), Adenin (vgl. S. 59 f.) und Acetat (vgl. S. 66 f.) überprüft. Aktivitätsänderungen der ICDH (z.B. Förderung der im Dunkeln abgesunkenen Aktivität durch ATP) durch die in den Konzentrationen 10^{-4}, $5 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-3} M (vgl. FISCHER, 1969) verwendeten Substanzen AMP, ADP, ATP, Acetat und Adenin waren nicht zu erreichen.

IV. DISKUSSION

Die Synchronisation sporulierender Grünalgen im Licht-Dunkel-Wechsel beruht auf der schon von TAMIYA et al. (1962) festgestellten Tatsache, daß die ersten Schritte der Zellentwicklung lichtabhängig sind, während die zur Teilung führenden Vorgänge ebenso wie die Teilungen selbst und die anschließende Sporulation grundsätzlich im Dunkeln ablaufen können. Bei optimaler Abstimmung von Licht- und Dunkelzeiten auf diese beiden Hauptabschnitte des Zellzyklus läßt sich die Synchronisation bei "kürzestmöglicher Generationsdauer" (PIRSON, LORENZEN und RUPPEL, 1963; PIRSON und LORENZEN, 1966) erzielen. Der Übergang von der asynchronen zur synchronen Kultur, die Synchronisierung, die nach wenigen Licht-Dunkel-Wechseln erfolgt, dürfte darauf zurückzuführen sein, daß Zellen durch die Belichtung in ihrer späteren Entwicklungsphase angehalten werden und die Verdunkelung jeweils auf eine weiter auflaufende Zahl in der Entwicklung fortgeschrittener Zellen trifft. Die "Dunkelphase" in der Zellentwicklung synchronisierbarer Algen kann danach in einem gewissen Sinne sogar als "photophob" (PIRSON und LORENZEN, 1966) bezeichnet werden. Starklichteinwirkung in diesem Entwicklungsabschnitt kann zu einer völligen Teilungshemmung führen (PIRSON und RUPPEL, 1962) und diese dann zu einer Synchronisation durch "Enthemmung" (PIRSON, LORENZEN und RUPPEL, 1963) herangezogen werden; im letzteren Fall ist die Generationsdauer künstlich verlängert und der Teilungseinsatz vom Augenblick der Verdunkelung bestimmt.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß in der autotrophen Chlorogonium-Zelle der gesamte Entwicklungsverlauf lichtabhängig ist. Damit entfällt die Vor-

aussetzung für komplette Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. Ausgehend von einer asynchronen Mischkultur gelingt es zwar durch geeignete Wahl der Licht- und Dunkelzeiten (im vorliegenden Fall 6:6 Stunden), jeweils einen Teil der Zellen zur Teilung zu bringen. Dies sind die Zellen, die während der Belichtung ihren Entwicklungsverlauf zum Abschluß bringen konnten; ein anderer Teil der Zellen kommt erst in der darauffolgenden Lichtzeit zur Teilung, so daß sogenannte "Gruppensynchronisation" (LORENZEN, 1957; PIRSON und SENGER, 1961) erzielt wird. Es ist jedoch zu beachten, daß die Teilungen nicht gleichmäßig bis zum Ende der Lichtzeiten anhalten; dies zwingt zu der Annahme, daß auch bei Chlorogonium neben der allgemeinen Lichtabhängigkeit des Zellstoffwechsels in einem späteren Abschnitt der Zellentwicklung eine Lichthemmung vorkommt. Dem entspricht die Beobachtung, daß Dauerlicht-Kulturen - auf gleiche Belichtungszeit bezogen - nicht die gleiche Produktion an Zellmaterial erreichen wie die Kulturen im Licht-Dunkel-Wechsel. Diese Lichthemmung ist möglicherweise korreliert mit einem relativ hohen Kohlenhydratgehalt.

Nach unseren Erfahrungen kann somit der vorliegende Chlorogonium-Stamm als ein lichtphysiologisch neuartiger Zelltyp angesehen werden. Ob es weitere Algen dieses Typs gibt, wird sich im ersten Schritt dadurch ermitteln lassen, daß man prüft, ob im Licht-Dunkel-Wechsel vollständige Synchronisation erzielt werden kann oder nicht.

Es fragt sich nun, welche Einzelvorgänge im Zellstoffwechsel bei einem durchgängig lichtabhängigen Zelltyp wie Chlorogonium elongatum St. 16 auf die Mitwirkung des Lichtes angewiesen sind. Zwar ist bei normalen Ernährungsbedingungen im Dunkeln keine Nettosynthese von Protein festzustellen (was jedoch turn over-Prozesse

nicht völlig ausschließt), doch zeigen unsere Versuche unter N-Mangelbedingungen, daß die Proteinsynthese auch im Dunkeln grundsätzlich möglich ist. Dies gilt jedoch nicht für die Bildung der DNA in der sogenannten S-Phase; bei dem gut synchronisierbaren Stamm 11-32/89 von Chlamydomonas reinhardii, der in der vorliegenden Arbeit mehrfach als Vergleichsorganismus herangezogen wurde, läßt sich dagegen eine DNA-Synthese im Dunkeln ohne weiteres feststellen, sofern man von asynchronen Kulturen ausgeht. Dem Einsetzen der Belichtung folgt in den vorverdunkelten Chlorogonium-Zellen, welche die S-Phase erreicht haben, ein rascher Beginn der DNA-Synthese, die ihrerseits im andauernden Licht von Zellteilungen gefolgt wird. Zwischen der DNA-Synthese und der Belichtung besteht also offensichtlich ein engerer Kausalzusammenhang. Wie die DNA-Synthese unterbleibt im Dunkeln auch die Kernteilung, die in teilungsbereiten Zellen bei Belichtung sogleich aufgenommen wird. Die Freisetzung der Zoosporen scheint jedoch lichtunabhängig zu sein; denn fertige Zoosporenmutterzellen konnten auch nach Ausschalten des Lichtes ihre Tochterzellen noch freisetzen. Da sich in der Chlorogonium-Kultur auch bei dem für die Synchronisation relativ günstigen Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$ stets verschiedene Zellstadien befinden, ist eine präzise Analyse des Zellzyklus mit großen Schwierigkeiten verbunden; zwar können in nicht synchronisierten Kulturen, zumal beim Vergleich mit entsprechenden Versuchsansätzen von Chlamydomonas, einige Anhaltspunkte für den Ablauf des Zellzyklus und die besondere Rolle des Lichtes gewonnen werden; es ist jedoch in Rechnung zu setzen, daß die so erhaltenen Daten immer nur auf einen Teil der Zellen bezogen werden dürfen, oder sogar gegenläufige Prozesse in den verschiedenen Stadien den Ablauf der Vorgänge verschleiern können.

Zunächst ist festzustellen, daß der Kohlenhydratschwund

im Dunkeln im wesentlichen auf Kosten der Atmung geht, während in anderen Fällen ein beträchtlicher Teil des Kohlenhydrats als Substrat für Dunkelsynthesen (RUPPEL, 1962) herangezogen wird. Wieweit die Dunkelatmung als Energielieferant für turn over-Vorgänge, die sich der Beobachtung durch einfache Zellanalysen entziehen, in Betracht kommt, muß in späteren Untersuchungen geklärt werden. Ein Vergleich der absoluten Höhe der Atmung von Chlorogonium mit anderen grünen Einzellern ist erschwert durch das Problem der Bezugsgröße; bei Bezug auf Gesamt-Stickstoff fanden wir für Chlamydomonas einen O_2-Verbrauch von 6,4 und für Chlorogonium von 6,0 $\mu g\ O_2/min \cdot mg$ Gesamt-Stickstoff, wobei berücksichtigt werden muß, daß die Wachstumsgeschwindigkeit von Chlorogonium nach STABENAU (1969; 1971) im Licht vergleichsweise sehr hoch ist. Gegenüber dieser hohen Produktion muß man die Dunkelatmung von Chlorogonium als niedrig ansehen.
Wenn auch die Synthese der DNA nicht der einzig vom Licht bestimmte Vorgang während der Zellentwicklung ist, so läßt sie doch diese Lichtabhängigkeit besonders gut demonstrieren. Hier ist bemerkenswert, daß Zugaben von Adenin und/oder Thymin bzw. auch von Kinetin eine sicher nachweisbare DNA-Synthese im Dunkeln auslösten und in der Folge sogar eine Zellteilung ermöglichten, nach unseren Beobachtungen der einzige Fall, in dem sich autotrophe Chlorogonium-Zellen im Dunkeln teilen können. Man kann daher annehmen, daß die Zufuhr dieser Basen dem Pool der Nucleotidvorstufen zugute kommt, der im Dunkeln sonst weitgehend entleert wird. Offenbar reicht bei solcher Nachhilfe der Energiezuschuß durch die Dunkelatmung aus, um den Lebenszyklus in einer begrenzten Zahl von Zellen zum Abschluß zu bringen. Daß die durch Basenzusätze ausgelösten Zellteilungen nicht zahlreicher sind und daher auch keine Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel herbeizuführen gestatten, kann verschiedene Ur-

sachen haben. So mag die Aufnahmefähigkeit für die betreffenden Basen limitierend wirken oder auch die Zahl der reaktionsfähigen Zellen begrenzt sein. Auf die Frage, welche Detailumsätze (z.B. Umwandlungen innerhalb der Purin- und Pyrimidinderivate) im gesamten Nucleinsäurestoffwechsel von den hier wirksamen Basen betroffen sein könnten, soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.
Eine bei Verdunkelung der Chlorogonium-Kulturen auffällige Erscheinung ist der DNA-Schwund, der mit verschiedenen Methoden nachgewiesen wurde und daher gesichert sein dürfte, zumal er beim Vergleichsorganismus Chlamydomonas unter entsprechenden Bedingungen nicht auftritt; der Schwund belief sich an Hand der UV-Bestimmung auf 10-14%. Diese Schwundrate ist nach Erfahrungen mit anderen Organismen (FICQ und BRACHET, 1971; CRIPPA und TOCCHINI-VALENTINI, 1971, an Xenopus; BAYEN und RODE, 1971, an Chlorella pyrenoidosa) reichlich hoch, um die Annahme zu rechtfertigen, daß es sich bei der betreffenden Fraktion um amplifizierte bzw. ribosomale DNA handele. Hierzu sind genauere Untersuchungen erforderlich.

Die naheliegende Erklärung für die Lichtabhängigkeit des Zellstoffwechsels von Chlorogonium mit einer obligaten Bindung an die Photophosphorylierung und damit einer weitgehenden Unabhängigkeit von der Tätigkeit der Mitochondrien, läßt sich nicht uneingeschränkt vertreten. Die Tatsache, daß die Isocitrat-Dehydrogenase (NAD^+- und $NADP^+$- abhängig) vom Licht-Dunkel-Wechsel stark beeinflußt ist, spricht dafür, daß die Aktivität der Mitochondrien selbst vom Licht gesteuert wird. Auch hier ist bemerkenswert, daß die Licht-Aktivierung bzw. Dunkel-Inaktivierung des Mitochondrienferments bei Chlamydomonas nicht beobachtet wird; dort ist eher eine leichte Steigerung im Dunkeln nachzuweisen. Zwar kann nach den bisher vorliegenden Befunden nicht ausgeschlossen

werden, daß die Inaktivierung der Isocitrat-Dehydrogenase im Dunkeln auf eine spezifische Verminderung der Synthese dieses Ferments im Rahmen eines Enzymturn over beruht, jedoch spricht das Fehlen einer Nettosynthese von Protein nicht für einen starken Umsatz innerhalb der Enzymgarnitur, zumal die von uns vermessene Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als nichtmitochondriales Enzym mit besonderer Bedeutung für Dunkelsynthesen keine bemerkenswerte Aktivitätsänderung zeigt. Die plausiblere Erklärung für die Aktivitätsschwankungen der Isocitrat-Dehydrogenase ist daher eine allosterische Regulation (PREISS und KOSUGE, 1970) durch Metabolite. Da weder ATP noch Extrakte aus belichteten Zellen im Fermentansatz eine wesentliche Aktivitätsänderung bewirkte, bleibt die Frage nach möglichen allosterischen Regulatoren der Mitochondrienaktivität vorerst offen. Eine Wirkung der Basenzusätze auf die Atmung verdient in diesem Zusammenhang Erwähnung. Es kann jedoch vorerst nur die allgemeine Arbeitshypothese aufgestellt werden, daß ein relativ labiles Produkt des Lichtstoffwechsels die Mitochondrientätigkeit und damit ihre Energielieferung in vivo anregt; im Dunkeln würde danach die relativ geringe Leistungsfähigkeit der Mitochondrien zur kritischen Größe für den normalen Zellstoffwechsel werden. Die im Verhältnis zur Licht-Produktion von Chlorogonium geringe Atmung kann eine solche Vorstellung stützen.

Wie von STABENAU (1971) ausführlich beschrieben, bedeutet bei Chlorogonium der Übergang von der autotrophen zur heterotrophen Ernährung mit Acetat eine abrupte Umstellung des Stoffwechsels. Wir können diese Feststellung bekräftigen durch den Nachweis, daß wenige Stunden nach Acetatzufuhr bei noch reichlichem Chlorophyllgehalt die Zellteilungen im Dunkeln in Gang kommen und

danach auf den Licht-Dunkel-Wechsel nicht mehr ansprechen.

Die an der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität gemessene Leistung der Mitochondrien ist bei Übergang zur Heterotrophie höher, und zwar stärker als die Maximalwerte, die aus belichteten autotrophen Zellen gemessen wurden. Den Mechanismus der durch Acetat ausgelösten Umstellung des Zellstoffwechsels im Detail aufzuklären, sollte gerade bei Chlorogonium eine interessante Aufgabe sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Einfluß von Licht-Dunkel-Wechseln, Temperaturwechseln, der Kombination von Licht-Dunkel-Wechsel mit Temperaturwechseln, von Rotlicht- (Blaulicht-) Dunkel-Wechseln, von Starklicht-Schwachlicht-Wechseln auf die Entwicklung und Teilung von Chlorogonium elongatum DANGEARD wurde untersucht.

2. Unter autotrophen Ernährungsbedingungen kam es, besonders deutlich im Licht-Dunkel-Wechsel 6:$\overline{6}$, zu einem Alternieren hoher und niedriger Teilungsschübe, ein Merkmal für sog. Gruppensynchronisation. Dagegen wurde eine komplette Synchronisation (Vollsynchronisation) in keinem Fall erreicht.

3. Teilungsschübe traten bei autotrophen Chlorogonien nur im Licht auf; im Dunkeln unterblieben Zellteilungen sowie Neubildung von Zoosporenmutterzellen (Teilungsstadien).

4. DNA-Synthese und Kernteilungen waren nur im Licht möglich; mit der Verdunkelung wurden diese Vorgänge sofort unterbrochen. Im Dunkeln sank der DNA-Gehalt sogar geringfügig ab (maximal bis 14%).

5. Im Dunkeln wurde unter normalen autotrophen Kulturbedingungen kein Anstieg des Stickstoffgehaltes pro Zelle festgestellt.
Nach N-Mangelbedingungen war jedoch ein Anstieg des Stickstoffgehaltes der Zellen nachweisbar; dieser ist also im Grundsatz lichtunabhängig. Die DNA-Synthese unterblieb dagegen im Dunkeln auch unter diesen Bedingungen ebenso wie die Kern- und Zellteilung.

6. Mit DCMU gehemmte Lichtkulturen vermehrten ihren N-Gehalt ebensowenig wie normale Dunkelkulturen. Zellvermehrung in geringem Umfang wurde aber festgestellt.

7. Adeninderivate und Thymin lösten im Dunkeln in beschränktem Umfang eine DNA-Synthese und Kern- bzw. Zellteilungen aus. Der O_2-Verbrauch (Dunkelatmung) war kurzfristig erhöht; der Gehalt an Zellstickstoff blieb dagegen konstant.

8. Die spezifische Enzymaktivität der mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase autotropher Zellen wurde bei Verdunkelung deutlich verringert. Im Licht-Dunkel-Wechsel $6:\overline{6}$ kam es zu ausgeprägten Aktivitätsschwankungen des Enzyms, die sich in einem Ansteigen der Aktivitäten im Licht und einem Absinken im Dunkeln bemerkbar machten. Ein Einfluß zelleigener allosterischer Effektoren ließ sich nicht mit Sicherheit nachweisen.
   Das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase änderte im Wechsellicht seine Aktivität nicht bemerkenswert.

9. Bei Ernährung mit Acetat ($+CO_2$) wurde die allgemeine Hemmung der Entwicklung autotropher Zellen im Dunkeln aufgehoben. Stickstoffzuwachs, DNA-Synthese, Kern- und Zellteilung laufen nun im Dunkeln ab; Licht-Dunkel-Wechsel führten nicht mehr zur Anhäufung von Zoosporenmutterzellen, d.h. Teilungsschübe blieben aus.

10. In heterotropher Kultur war die spezifische Enzymaktivität der mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase bedeutend höher als in autotrophen Zellen.

11. Die Bedeutung des Lichts für die Entwicklung autotroph ernährter Chlorogonium-Zellen, auch im Hinblick auf ihre Synchronisierbarkeit, wird diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

BARMAN,T.E., 1969: Enzyme Handbook, Vol. I
Berlin - Heidelberg - New York

BAYEN,M. und RODE,A., 1971: Etude des acides désoxyribonucléiques de Chlorella pyrenoidosa. Mise en évidence et propriétés des ADN satellites. - C.R.Acad.Sc. Paris, 271, 2046-2049

BECHER,G., SCHNEIDERMANN,M. und WILLIAMS, G.Z., 1956: Evaluation of electronic red blood cell counter. - Americ.Journ.Clin.Path. 26, 1439-1449

BERGER,CH., 1964: Aktivitätsänderungen einiger Enzyme während der Zellentwicklung synchronisierter Chlorella-Zellen. - Dissertation Göttingen

BÖGER, P., 1964: Das Strukturproteid aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. - Flora 154, 174-211

BRADSTREET,R.B., 1965: The Kjeldahl method for organic nitrogen. - Acad.Press, New York

BURTON, K., 1956: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamin reaction for the colometric estimation of deoxyribonucleic acid. - Biochem.J. 62, 315-323

CERIOTTI,G., 1952: A microchemical determination of desoxyribonucleic acid.- J.biol.Chem. 198, 297-299

CERIOTTI,G., 1955: Determination of nucleic acids in animals tissues. - J.biol.Chem. 214, 59-68

CHEN, R.F. und PLAUT, G.W.E., 1963: Activation and inhibition of DPN-linket isocitrate dehydrogenase of heart by certian nucleotides. - Biochemistry 2, 1023-1032

COMAR,C.L. und ZSCHEILE,F.P., 1942: Analysis of plant extracts for chlorophylls a and b by a photoelectric spectrophotometric method. - Plant Physiol. 17, 198-209

CRAMER,F., 1962: Papierchromatographie (Weinheim)

CRIPPA,M. und TOCCHINI-VALENTINI,G.P., 1971: Synthesis of amplified DNA that codes for ribosomal RNA. - Proc.nat. Acad.Sci.(Wash.) 68, 2769-2773

CUMMINS,J.E. und MITCHISON,J.M., 1967: Adenine uptake and pool formation in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. - Biochim.Biophys.Acta 136, 108-120

DANGEARD,P.A., 1888 a: Recherches sur les algues inférieures. - Ann.Sci.nat.Bot. 7, 105-175

DANGEARD,P.A., 1888 b: La sexualité chez quelches algues inférieures. - Journ.Botanique 2, 350-353

DARLINGTON,C.D. und LA COUR,R.F., 1963: Methoden der Chromosomenuntersuchung (Stuttgart)

DAVIS,B.J., 1964: Disc electrophoresis II, Method and application to human serum. - Ann.NY Acad.Sci. 121, 404-427

VON DENFFER,D., 1950: Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen.-Arch.Mikrobiol. 14, 159-202

FEIERABEND,J., 1965: Differenzierungsmuster und Regulationsvorgänge im Enzymsystem von Roggenkeimlingen. Dissertation Göttingen

FICQ,A. und BRACHET,J., 1971: RNA-dependent DNA polymerase: possible role in the amplification of ribosomal DNA in Xenopus oocytes. - Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 68, 2774-2776

FISCHER,E., 1969: Wechselseitige Beeinflussung von CO_2- und Acetat-Assimilation bei Euglena gracilis KLEBS. - Dissertation Göttingen

GERHARDT,B. und BERGER,CH., 1971: Microbodies und Diaminobenzidin-Reaktion in den Acetat-Flagellaten Polytomella caeca und Chlorogonium elongatum. - Planta (Berl.) 100, 155-166

HAIS,J.M., 1958: Nachweis und Bestimmung getrennter Substanzen. In: "Handbuch der Papierchromatographie", Bd.I, Grundlagen und Technik, S.160-198, Hrsg.: J.M.HAIS und K.MACEK, 1958 (Jena)

HALLDAL,P., 1958: Action spectra of phototaxis and related problems in Volvocales, Ulva-Gametes and Dinophyceae. Physiol.Plantarum (Copenh.) 11, 118-153

HARTMANN,M., 1956: Die Sexualität (Stuttgart)

HATHAWAY,J.A. und ATKINSON,D.E., 1963: The effect of adenylic acid on yeast nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase, a possible metabolic control mechanism. - J.Biol.Chem. 238, 2875-2881

HAUPT,W., 1959: Die Phototaxis der Algen. In: "Handbuch der Pflanzenphysiologie", Bd.XVII/1, S.318-370, Hrsg.: W.RUHLAND und Mitarb., 1959 (Berlin - Göttingen - Heidelberg)

HESSE,M., 1972: Endogene Rhythmik der Produktivität bei Chlorella und ihre Beeinflussung durch Licht. - Z.Pflanzenphysiol. 67, 58-77

JACOBSEN,H.C., 1910: Kulturversuche mit einigen niederen Volvocalen. - Zeitschr.Bot. 2, 145-188

JOST,J.-P. und RICKENBERG, H.V., 1971: Cyclic AMP. Ann.Rev.Biochem. 40, 741-774

KATES,J.R. und JONES,R.F., 1967: Periodic increases in enzyme activity in synchronized cultures of Chlamydomonas reinhardtii (Stamm 89-3-d). - Biochim.Biophys. Acta 145, 153-158

KECK,K., 1956: An ultramicrotechnique for the determination of DNA. - Arch. Biochem.Biophys. 63, 446-451

KIM,J.H. und STAMBUK,B.K., 1966: Synchronization of HeLa cells by vinblastine sulfate. - Exp.Cell Res. 44, 631-634

KORSCHIKOFF,A.A., 1923: Zur Morphologie des geschlechtlichen Prozesses bei den Volvocales. - Russ.Protistol. Arch. 2, 179-194

KOWALLIK,W., 1962: Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlorellen. - Planta (Berl.) 58, 337-365

KOWALLIK,W., 1963: Die Zellteilung von Chlorella im Verlaufe einer Farblichtkultur. - Planta (Berl.) 60, 100-108

KUHL,A., 1962: Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Phosphate in Chlorella. - Vortr. Botan.hrsg.Dtsch.Bot.Ges.(N.F.)1, 157-166 (Stuttgart)

KUHL,A. und LORENZEN,H., 1964: Handling and culturing of Chlorella. In: "Methods of Cell Physiology", Vol.I , S.159-187 , Hrsg.: D.M.PRESCOTT, 1964 (Academic Press, New York)

LAUDENBACH,B. und PIRSON,A., 1969: Über den Kohlenhydrat-Umsatz in Chlorella unter dem Einfluß von blauem und rotem Licht. - Arch.Mikrobiol. 67, 226-242

LOENING, U.E., 1969: The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. - Biochem.J. 113, 131-138

LORENZEN,H., 1957: Synchrone Zellteilungen von Chlorella bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. - Flora 144, 473-496

LORENZEN,H., 1959: Die photosynthetische Sauerstoffproduktion von Chlorella bei kurzfristig intermittierender Belichtung. - Flora 147, 382-404

LORENZEN,H., 1963: Temperatureinflüsse auf Chlorella pyrenoidosa unter besonderer Berücksichtigung der Zellentwicklung. - Flora 153, 554-592

LORENZEN,H., 1970: Synchronous cultures. In: "Photobiology of microorganisms", S.187-212, Hrsg.: P.HALLDAL, 1970 (London - New York - Sydney - Toronto)

LORENZEN,H. und RUPPEL,H.G., 1960: Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der Chlorella-Zelle. - Planta (Berl.) 54, 394-403

LORENZEN,H. und HESSE,M., 1968: Nachweis endogen bedingter Leistungsschwankungen bei Chlorella. - Z.Pflanzenphysiol. 58, 454-456

LORENZEN,H. und VENKATARAMAN,G.S., 1969: Synchronous cell division in Anacystis nidulans RICHTER. - Arch.Mikrobiol. 67, 251-255

LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L. und RANDALL, R.J., 1951: Protein measurement with the folin phenol reagens. - J.biol.Chem. 193, 265-275

MACKINNEY,G., 1941: Absorption of light by chlorophyll solutions. - J.biol.Chem. 140, 315-322

MAINX,F., 1929: Untersuchungen über den Einfluß von Außenfaktoren auf die phototaktische Stimmung. - Arch.Protistenkde. 68, 105-176

MARKHAM,R. und SMITH,J.D., 1951: Chromatographic studies of nucleic acids. - Biochem.J. 49, 401

MEFFERT,M.E., 1954: Ein Beitrag zur Wirkung diskontinuierlicher Belichtung auf die Massen- und Individuenvermehrung von Chlorella vulgaris. - Arch.Mikrobiol. 20, 410-422

MITCHISON,J.M., 1971: The biology of the cell cycle (Cambridge University Press)

MITCHISON,G.J. und WILCOX,M., 1972: Rule governing cell division in Anabaena. - Nature 239, 110-111

MUKERJI,S.K., SANWAL,G.G. und KRISHNAN,P.S., 1961: Diurnal variation in transaminase activity in cactus plant. - Nature 191, 516-517

OGUR,M. und ROSEN,G., 1950: The nucleic acids of plant tissues I. The extraction and determination of deoxypentose and pentose nucleic acid. - Arch.Biochem. 25, 262-276

OLTMANNS,F., 1923: Morphologie und Biologie der Algen (Jena)

ORNSTEIN,L., 1964: Disc electrophoresis I, Background and theory. - Ann.NY Acad.Sci. 121, 321-349

PÁDR,Z., 1958: Purine, Pyrimidine, stickstoffhaltige Komponenten der Nucleinsäuren. In: "Handbuch der Papierchromatographie", Bd.I, Grundlagen und Technik, S.524-544, Hrsg.: J.M.HAIS und K.MACEK, 1958 (Jena)

PASTAN,J. und PERLMAN,R.L., 1971: Cyclic AMP in metabolism. Nature (New Biology) 229, 5-7

PIRSON,A. und SENGER,H., 1961: Synchronisationstypen bei Chlorella im Licht-Dunkel-Wechsel. - Naturwissenschaften 48, 81

PIRSON,A. und RUPPEL,H.G., 1962: Über die Induktion einer Teilungshemmung in synchronen Kulturen von Chlorella. - Arch.Mikrobiol. 42, 299-309

PIRSON,A., LORENZEN,H. und RUPPEL,H.G., 1963: Der Licht-Dunkel-Wechsel als synchronisierendes Prinzip. - Microalgae & Photosynthetic Bacteria, 127-139 (Plant Cell Physiol., Tokyo, 1963)

PIRSON,A. und LORENZEN,H., 1966: Synchronized dividing algae. - Ann.Rev.Plant Physiol. 17, 439-458

PREISS,J. und KOSUGE,T., 1970: Regulation of enzyme activity in photosynthetic systems. - Ann.Rev.Plant Physiol. 21, 433-466

PRINGSHEIM,E.G., 1937: Beiträge zur Physiologie saprotropher Algen und Flagellaten.-Die Stellung der Acetatflagellaten in einem physiologischen Ernährungssystem. - Planta 27, 61-92

PRINGSHEIM,E.G., 1967: Zur Ernährungsphysiologie mixotropher Volvocineen. - Flora Abt.A 157, 407-425

PRINGSHEIM,E.G. und WIESSNER,W., 1960: Photoassimilation of acetate by green organisms. - Nature 188, 919-921

RICHTER,G. und SENGER,H., 1964: Isolierung und Charakterisierung der Nucleinsäuren aus Pflanzenzellen. - Ber.Deutsch.Bot.Ges. 77, 174-181

ROBBINS,E. und MARCUS,P.J., 1964: Mitotically synchronized mammalian cells: A simple method for obtaining large populations. - Science 144, 1152

ROE,J.H., 1955: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. - J.biol.Chem. 212, 335-343

ROONEY,D.W., YEN,B.-C., MIKITA,D.J., 1971: Synchronization of Chlamydomonas division with intermittent hypothermia. - Exptl.Cell Res. 65, 94-98

RUPPEL,H.G., 1962: Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. - Flora (Jena) 152, 113-118

RUPPEL,H.G. und VAN WYK,D., 1965: Über die Desoxyribonucleinsäure in Chloroplasten von Antirrhinum majus. - Z.Pflanzenphysiol. 53, 32-38

RUTHMANN,A., 1966: Methoden der Zellforschung (Stuttgart)

SENGER,H., 1961: Untersuchungen zur Synchronisierung von Chlorella-Kulturen. - Arch.Mikrobiol. 40, 47-72

SENGER,H., 1962: Über die Wirkung von Glucose und Kohlensäure auf das Wachstum synchroner Chlorella-Kulturen. - Vortr.Bot.hrsg.Dtsch.Bot.Ges.(N.F.) 1, 205-216

SENGER,H., 1965: Die teilungsinduzierende Wirkung des Lichtes in mixotrophen Synchronkulturen von Chlorella. - Arch.Mikrobiol. 51, 307-322

SCHLÖSSER, U., 1966: Enzymatisch gesteuerte Freisetzung von Zoosporen bei Chlamydomonas reinhardii DANGEARD in Synchronkultur. - Arch.Mikrobiol. 54, 129-159

SCHMIDT,G.L. und KAMEN,M.D., 1971: Control of chlorophyll synthesis in Chromatium vinosum. - Arch.Mikrobiol. 76, 51-64

SOROKIN,C. und KRAUSS,R.W., 1959: Maximum growth rates of Chlorella in steady-state and in synchronized cultures. - Proc.Nat.Acad.Sci. 45, 1740-1744

SPOEHR,H.A. und MILNER,H.W., 1949: The chemical composition of Chlorella; effect of environmental conditions. - Plant Physiol. 24, 120-149

STABENAU,H., 1969: Der Einfluß von Licht und Acetat auf Chlorogonium elongatum DANGEARD. - Dissertation Göttingen

STABENAU,H., 1971: Die Regulation des Photosyntheseapparates bei Chlorogonium elongatum DANGEARD unter dem Einfluß von Licht und Acetat. - Biochem.Physiol.Pflanzen 162, 371-385

STABENAU,H., 1972 a: Über die Ausscheidung von Glykolsäure bei Chlorogonium elongatum DANGEARD. - Biochem. Physiol.Pflanzen 163, 42-51

STABENAU,H., 1972 b: Aktivitätsänderungen von Enzymen bei Chlorogonium elongatum unter dem Einfluß von rotem und blauem Licht. - Z.Pflanzenphysiol. 67, 105-112

STABENAU,H., 1973: Untersuchungen über die Aufnahme von Glykolat bei Chlorogonium. - Planta (Berl.) 109, 177-183

STEUP,M., 1972: Über Beziehungen zwischen Kohlenhydrat-, Protein- und Phosphatstoffwechsel bei Chlamydomonas reinhardii DANGEARD im blauen und roten Spektralbereich. - Dissertation Göttingen

STREHLOW,K., 1928/29: Über die Sexualität einiger Volvocales. - Zeitschr.Bot. 21, 625-692

TAMIYA,H., IWAMURA,T., SHIBATA,K., HASE,E. und NIHEI,T., 1953: Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of Chlorella. - Biochim.Biophys.Acta 12, 23-40

TAMIYA,H., MORIMURA,Y., YOKOTA,M.,1962: Effects of various antimetabolites upon the life cycle of Chlorella. - Arch.Mikrobiol. 42, 4-16

TRUESDALE,G.A., DOWNING,A.L. und LOWDEN,G.F., 1955: The solubility of oxygen in pure water and sea-water. - J.Appl.Chem. 5, 53

ULRICH,W., 1963: Vergleichende Untersuchungen an Euglena und Chlorella bei autotropher, mixotropher und heterotropher Ernährung. - Dissertation Göttingen

VERLY,W.G. und PETITPAS-DEWANDRE,A., 1964: Utilization of labelled "Myleran" for the determination of the size DNA molecules in cells. - Nature 203, 865-867

WANKA,F., 1959: Untersuchungen über die Wirkung des Lichts auf die Zellteilung von Chlorella pyrenoidosa. - Arch.Mikrobiol. 34, 161-188

WANKA,F., 1962 a: Die Bestimmung der Nucleinsäuren in Chlorella-Kulturen. - Planta 58, 594-609

WANKA,F., 1962 b: Über den Einfluß des Lichts auf die Nukleinsäuresynthese bei Synchronkulturen von Chlorella pyrenoidosa. - Ber.Deutsch.Bot.Ges. 75, 457-464

WEGMANN,K. und METZNER,H., 1971: Synchronization of Dunaliella cultures. - Arch.Mikrobiol. 78, 360-367

WIESSNER,W., 1963: Stoffwechselleistung und Enzymaktivität bei Chlamdobotrys (Volvocales). - Arch.Mikrobiol. 45, 33-45

WIESSNER,W., 1968: Enzymaktivität und Kohlenstoffassimilation bei Grünalgen unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Typs. - Planta (Berl.) 79, 92-98

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. A. Pirson, danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und für freundliche Unterstützung durch hilfreiche Diskussionen.

Lebenslauf

Holger Siegfried Zeidler, geboren am 5. Oktober 1941 in Glauchau als Sohn des Lehrers Hellmut Zeidler und seiner Ehefrau, der Lehrerin Ursula Zeidler, geb. Gerstenhauer. Seit 8. Oktober 1971 verheiratet mit der technischen Assistentin Gerda Zeidler, geb. Wirth.

1948 - 1956	Grundschule in Hohenstein-Ernstthal
26.Juni 1956	Abschlußprüfung der Grundschule
1956 - 1957	Oberschule in Glauchau
1958 - 1962	Gymnasium (Herschelschule) in Hannover
19.Februar 1962	Reifeprüfung
8.Mai 1962	Beginn des Studiums in Biologie, Chemie und Russisch an der Georg-August-Universität Göttingen
16.Juni 1969	Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien (1. Staatsexamen) in den Fächern Botanik, Zoologie, Chemie und Pädagogik
1.August 1969	Einstellung als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen bei Prof. Pirson
29.November 1972	Ernennung zum wissenschaftlichen Assistenten

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Pirson im Pflanzenphysiologischen Institut durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Dozenten und Professoren
Amelunxen, Ax, Bergmann, Birukow, Braun, Brockmann, Bünsow, Ellenberg, Funke, Glemser, Hillebrandt, Lorenzen, Piepho, Pirson, Pollok, Roth, Schnepf, Trebst, Wießner.